JULIANA COLOZZO GREGÓRIO

**ESTUDO DO EFEITO DA REMEDIAÇÃO SIMULTÂNEA
DOS GENES p16^{INK4a} E p53 MEDIADA PELO
ADENOVÍRUS BICISTRÔNICO Adp16IRESp53 EM UM
MODELO DE CARCINOMA DE PULMÃO HUMANO**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

São Paulo
2008

JULIANA COLOZZO GREGÓRIO

**ESTUDO DO EFEITO DA REMEDIAÇÃO SIMULTÂNEA DOS GENES
p16^{INK4a} E p53 MEDIADA PELO ADENOVÍRUS BICISTRÔNICO
Adp16IRESp53 EM UM MODELO DE CARCINOMA DE PULMÃO
HUMANO**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

Área de Concentração:
Biotecnologia

Orientador (a):
Prof^a Dra. Eugenia Costanzi Strauss

São Paulo
2008

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

Candidato(a): Juliana Colozzo Gregorio.

Título da Tese: Estudo do efeito da remediação simultânea dos genes p16^{INK4a}
e p53 mediada pelo adenovírus bicistrônico Adp16IRESp53
em um modelo de carcinoma de pulmão humano.

Orientador(a): Eugenia Constanzi-Strauss.

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

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **016** nas fls. **29** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do(a) Prof.(a) Dr.(a) Eugênia Costanzi Strauss, Coordenador(a) da Linha de Pesquisa "**Desenvolvimento de modelos animais para o estudo da proliferação de células tumorais humanas**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Juliana Colozzo Gregório**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **23.02.2006**.

São Paulo, 06 de março de 2006.

Profa. Dra. Marília C.L. Seelaender
Coordenadora -CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. Patrícia Castelucci
Secretária Suplente CEEA – ICB/USP

CEEA: Novo procedimento a partir de março de 2002

O Ofício Circular da CEEA [Comissão de Ética em Experimentação Animal] de 19 de fevereiro de 2002 diz:

"Em função do ainda constante número dos protocolos enviados à apreciação da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) referentes à utilização e manuseio de animais em pesquisas que já foram realizadas, ou estão em fase final de realização, solicitamos à CPG que envie aos orientadores credenciados na PG do ICB as informações abaixo.

1. A CEEA existe desde 1998. Seu caráter é preventivo, normativo e de orientação sobre a utilização de animais em experimentos segundo regras éticas aceitas internacionalmente.
2. Os pesquisadores devem preencher e enviar à CEEA o protocolo fornecido por esta Comissão com as informações pertinentes ao uso adequado dos animais em pesquisas. A SEREM DESENVOLVIDAS não de pesquisas em andamento ou já terminadas.
3. Em consonância com os objetivos da CEEA e do ICB, a CPG normatizou a obrigatoriedade da apresentação do Certificado desta Comissão no Exame de Qualificação.
4. Esclarecemos que os pesquisadores podem submeter à CEEA um protocolo único para a linha de pesquisa que desenvolvem, e que o mesmo pode ser utilizado para vários projetos **que empreguem o mesmos procedimentos experimentais.**

Assim sendo, informamos nossa decisão de não mais fornecer, **a partir de março de 2002**, os certificados a projetos já em curso. Neste sentido, solicitamos a V.Sa. o obséquio de notificar os respectivos orientadores e pesquisadores credenciados no Programas de PG do ICB sobre esta

DEDICATÓRIA

*Aos meus queridos pais Osvaldo e Magali e ao meu irmão Junior,
Pelo amor incondicional...
Pelos valiosos ensinamentos de valores fundamentais como respeito, perseverança
e humildade... Obrigada por sempre confiar e apoiar as minhas escolhas.*

Ao meu amor Murilo,

E a todos que um dia possam se beneficiar desta pesquisa...

AGRADECIMENTOS

São momentos raros como este que temos a oportunidade de agradecer as pessoas que muito colaboraram para que este trabalho fosse realizado.

A Deus, por sempre iluminar minhas escolhas...

À Dra. Eugenia Costanzi-Strauss, pela confiança em mim depositada para a realização desse projeto tão importante. Obrigada pelos ensinamentos na bancada e pelas valiosas discussões dos resultados, que me serviram de base não somente durante o período do trabalho desenvolvido, como também na carreira científica que se inicia.

Ao Dr. Bryan E. Strauss (Setor de vetores virais, Laboratório de Genética e Cardiologia molecular, InCor-FM-USP), por me ensinar e me auxiliar em vários experimentos, abrindo as portas de seu laboratório e, pelas importantes sugestões que sempre contribuíram para o constante aprimoramento do trabalho.

À equipe do Dr. Bryan – Paula, Carol, Dani, Márcio, Rafael, Vinícius, Christian, por todo o apoio recebido e pelas horas de descontração.

Às amigas da equipe anterior do laboratório de terapia gênica - Lia Muschellack e Patrícia Léo, pela atenção dispensada principalmente nos estágios iniciais desse trabalho.

Aos amigos da equipe atual do laboratório de terapia gênica – Patrícia Duarte, Felipe Sampaio, Mari Kussuki, Carolina Quinones Bueno, Roberta Ferrari Mourão, Antônio Augusto Pires, José Antônio Turri e Teiti Yagura, por sempre serem solícitos a qualquer pedido de ajuda e pelos alegres momentos de descontração. Valeu galera!!!!

Ao Instituto de Ciências Biomédicas e ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, por fornecerem as condições necessárias para realização dos experimentos.

À Dra. Edna Teruko Kimura e ao Dr. Emer Suavinho Ferro (Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, ICB-USP) e suas equipes, pela permissão ao uso de seus microscópios de fluorescência.

Ao Dr. Rui Curi (Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB-USP), e toda a sua equipe, pelo uso do citômetro de fluxo e por disponibilizar qualquer outro equipamento em seu laboratório.

Ao Dr. Luiz Roberto G. Britto e sua equipe (Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB-USP), em especial ao Adilson da Silva Alves, pelo auxílio na captura de imagens no microscópio confocal.

Ao Dr. Carlos Eduardo Winter (Departamento de Parasitologia, ICB-USP), por permitir o uso da ultracentrífuga.

À Claudia Madalena Cabrera Mori, responsável pelo biotério do Departamento de Patologia da FMVZ-USP.

Ao Dr. Francisco Laurindo (Laboratório de Biologia vascular do InCor-FM-USP), em especial à Ana Garippo, pelos serviços prestados na captura das imagens no microscópio confocal.

À Rosana Prisco (Serviço de estatística do ICB-USP), pela realização da análise estatística.

Ao Centro de Estatística Aplicada (CEA), IME -USP, pelo auxílio à complementação das análises estatísticas dos resultados *in vivo*.

Ao Dr. Marcus Vinícius C. Baldo (Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB-USP), pelo auxílio aos cálculos das equações da análise estatística dos resultados *in vivo*.

Ao Dr. Carlos Frederico Martins Menck (Departamento de Microbiologia, ICB-USP), por permitir a utilização do equipamento de PCR em tempo real.

Ao Dr. Cristóforo Scavone (Departamento de Farmacologia, ICB-USP) e sua equipe, por permitir a utilização do microscópio de fluorescência e, em especial a Lídia Yshii pela grande colaboração nessa fase final de confecção da tese.

Às minhas queridas amigas de jornada Sandra Matsuda e Fabiana Andrielli, pelo carinho, companheirismo e amizade...Sandra, muito obrigada pela ajuda na realização das figuras.

A toda minha família e aos amigos de São João da Boa Vista, que sempre torcem por minhas vitórias...

Ao meu grande amor Murilo e família, pelo imensurável apoio e conforto em todas as horas...

A todos aqueles não citados, mas que de alguma forma contribuíram para a realização do trabalho e concretização de mais uma etapa.

A CAPES e a FAPESP (processo nº 05/55631-9), pelo auxílio financeiro.

Ao MCT-CNPq-Instituto do Milênio Rede de Terapia Gênica, pelo suporte financeiro concedido para realização deste trabalho.

Às vezes mergulhamos fundo
Sabemos que outros já o fizeram
Mas, não sabemos o que encontraremos.
Sentimo-nos sós
Em meio a escuridão, nos questionamos ferozmente.
Prosseguimos...
Nosso ar vai ficando mais valioso
Então...
Encontramos algo diferente
Analisamos por diversos ângulos
Descobrimos que o mergulho não foi em vão
Subimos obedecendo às normas
Chegamos à superfície.
A satisfação vem em forma de sorriso
Sim
Alimentamos nossa terna companhia
A esperança!

Murilo Pires de Campos Rodrigues Alves

RESUMO

Gregório JC. Estudo do efeito da remediação simultânea dos genes p16^{INK4a} e p53 mediada pelo adenovírus bicistrônico Adp16IRESp53 em um modelo de carcinoma de pulmão humano [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Os genes p16^{INK4a} e p53 são fortes supressores tumorais que atuam em diferentes vias bioquímicas do controle do ciclo celular e na manutenção da integridade do genoma. Considerando que várias mutações gênicas estão envolvidas no estabelecimento dos tumores, surge a idéia de que o alcance da melhor eficiência no tratamento do câncer é dado pela entrega de múltiplos genes. Este trabalho apresenta a construção, produção e caracterização funcional *in vitro* e *in vivo* do vetor adenoviral bicistrônico Adp16IRESp53 e dos monocistrônicos Adp16 e Adp53 em modelo de câncer de pulmão. A principal linhagem utilizada para modelo experimental foi a NCI-H358, derivado de carcinoma de células não-pequenas de pulmão humano. Também realizamos algumas análises em outra linhagem de carcinoma de pulmão humano, denominada A549. Essas linhagens possuem perfis mutacionais diferentes, as células H358 não expressam os genes p16^{INK4a} e p53 e as células A549 são p16^{INK4a} deficientes, mas carregam cópia selvagem de p53. Nossos resultados indicam que as células H358 respondem a transdução com o Adp16IRESp53 com forte indução de morte celular, das comparados com vetores monocistrônicos Adp16, Adp53 ou o *reporter* AdeGFP e/ou AdLacZ. E mais, o vetor bicistrônico apresentou superioridade no efeito de morte celular quando comparado com os vírus Adp16 e Adp53 também em ensaios de co-transdução. Nesse trabalho, também delineamos o perfil transcricional de alguns genes relacionados com ciclo de vida de células H358 após transdução com adenovírus bicistrônico Adp16IRESp53. Utilizando ensaios de PCR em tempo real, observamos que os transgenes p16^{INK4a} e p53 são expressos com melhor eficiência pelos vírus de configuração bicistrônica do que os vírus monocistrônicos Adp16 e Adp53. Observamos que os genes p21^{WAF1} e o pró-apoptótico Bax estão mais expressos nas células transduzidas com Adp16IRESp53, do que nas células transduzidas com Adp16 ou Adp53. Em contraste, a expressão dos genes de sobrevida celular FoxO e o antiapoptótico *survivin* (SVV) foi especialmente reduzida nas células que receberam Adp16IRESp53. Nos ensaios *in vivo*, as células H358 foram implantadas no subcutâneo de camundongos atímicos Balb/C *nude*. Os resultados revelam significativa redução do volume dos tumores tratados com o vetor adenoviral Adp16IRESp53. Em conclusão, nossos resultados mostram que a combinação entre os genes p53 e p16^{INK4a}, veiculada pelo vírus Adp16IRESp53, é uma estratégia contra a proliferação de células H358 e A549 mais eficiente do que a estratégia de remediação de apenas p16^{INK4a} ou p53. E que Adp16IRESp53 pode ser considerado como candidato para participação em ensaios de terapia gênica para câncer de pulmão.

Palavras-chave: p16^{INK4a} e p53; Vetor adenoviral bicistrônico; Carcinoma pulmonar humano; Morte celular.

ABSTRACT

Gregório JC. Effect of the simultaneous replacement of p16^{INK4a} and p53 genes mediated by a bicistronic adenovirus Adp16IRESp53 in a human lung carcinoma model [Thesis] - São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

This work presents the construction, production and functional evaluation *in vitro* and *in vivo* of the bicistronic adenoviral vector Ap16IRESp53 as well as the monocistronic vectors Adp16 and Adp53 in a lung cancer model. The p16^{INK4a} and p53 genes are strong tumor suppressors that act in different pathways of cell cycle control. Considering that several mutation events are involved in tumorigenesis, comes the idea that a greater efficiency in cancer treatment would be reached with delivery of multiples genes. The principal cell line used in this experimental model was H358, derived from human pulmonary carcinoma. The cell line A549, derived from human pulmonary carcinoma, also has been used in our study. Each of these lines present distinct mutational profiles. Our data demonstrate a strong cell death effect in H358 cells transduced with Adp16IRESp53 when compared with Adp16, Adp53 or the reporter AdeGFP and/or AdLacZ. In addition, the bicistronic vector showed a superior effect in cell death than Ap16 and Adp53 delivery in co-transduction assays. In this work, we have also begun to trace a transcriptional profile of genes correlated with cell cycle control of H358 cells post-transduction with bicistronic adenovirus Adp16IRESp53. Real-time PCR demonstrated that p16 and p53 transgenes are expressed more efficiency in the bicistronic configuration than in the Adp16 and Adp53 monocistronics. We have observed that p21^{WAF1} and pro-apoptotic Bax genes are more expressed in the Adp16IRESp53-transduced cells. In contrast, expression of FoxO and the antiapoptotic survivin (SVV) genes were especially reduced in the cells that received Adp16IRESp53. For the *in vivo* studies, we have used H358 cells implanted subcutaneously in athymic Balb/c nude mice. Our data show significant suppression of tumors treated with the therapeutic adenoviral vectors. In conclusion, the simultaneous replacement of p16^{INK4a} and p53, mediated by the bicistronic vector, may prove to be a promising strategy for gene therapy of lung cancer.

Keywords: p16^{INK4a} and p53; Bicistronic adenoviral vector; Human lung carcinoma; Cell death

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação simplificada do controle do ciclo celular.....	29
Figura 2. Adenovírus selvagem.....	37
Figura 3. Vias de interação e condução do Ad5 na célula hospedeira.....	39
Figura 4. Gráfico demonstrando a utilização dos principais vetores em protocolos de terapia gênica.....	40
Figura 5. Esquema representativo da obtenção dos plasmídeos de entrada e de vetores adenovirais.....	47
Figura 6. Representação esquemática da posição dos oligonucleotídeos na construção plasmideal pAdp16IRESp53.....	51
Figura 7. Caracterização das construções dos plasmídeos de entrada pENTR2BΔeGFP, pENTR2BΔp16, pENTR2BΔp53 e pENTR2BΔp16IRESp53...	69
Figura 8. Caracterização das construções dos vetores adenovirais pAdeGFP, pAdp16, pAdp53 e pAdp16IRESp53.....	70
Figura 9. Avaliação da presença de vírus competentes de replicação (RCA) nas produções de Adp53 e Adp16IRESp53.....	71
Figura 10. Avaliação da eficiência de transdução das células H358.....	75
Figura 11. Expressão dos cDNAs de p16 e p53 mediada pelos adenovírus monocistrônicos Adp16 e Adp53 e pelo adenovírus bicistrônico Adp16IRESp53.	76
Figura 12. Imunocitoquímica das células H358 transduzidas com os vetores virais AdLacZ e Adp16.....	77
Figura 13. Imunocitoquímica das células H358 transduzidas com os vetores virais Adp53 e Adp16IRESp53.....	78
Figura 14. Integridade funcional do elemento IRES e da proteína p53 selvagem mediada pelo vírus Adp53 e Adp16IRESp53.....	82
Figura 15. Cinética de inibição de E2F e redução de pRb fosforilado nas células H358 ^{Adp16} , H358 ^{Adp53} e H358 ^{Adp16IRESp53}	83
Figura 16. Curva de crescimento das células H358 transduzidas com os vírus AdeGFP, Adp16, Adp53 e adp16IRESp53.....	87
Figura 17. Curvas representando as cinéticas das fases do ciclo celular nas células H358 transduzidas com os vírus AdeGFP, Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53.....	88

Figura 18. Análise do efeito da co-transdução Adp16+Adp53 <i>versus</i> Adp16IRESp53 das células H358 após 96 horas de transdução.....	91
Figura 19. Análise da indução de senescência e medidas de tamanho das células H358 ^{Adp16} , H358 ^{Adp53} e H358 ^{Adp16IRESp53}	93
Figura 20. Adp16IRESp53 provoca morte celular dependente de caspase-3.....	94
Figura 21. Quantificação relativa da expressão de MDM2 e Bax em células H358 após transdução viral.....	96
Figura 22. Quantificação relativa dos transcritos de SVV e FoxO nas células H358 após transdução viral.....	97
Figura 23. Análise do ciclo e morte celular após 72 horas de transdução nas células A549 ^{Adp16} , A549 ^{Adp53} e A549 ^{Adp16IRESp53}	99
Figura 24. Transdução <i>in vivo</i> (<i>in situ</i>) dos tumores derivados de H358 com AdLacZ.....	102
Figura 25. Curva de crescimento dos tumores H358 tratados com Adp16, Adp53, Adp16IRESp53 e o controle AdLacZ em camundongos <i>nude</i>	103
Figura 26. Apoptose em cortes histológicos de tumores de H358 tratados com AdLacZ (controle negativo), Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53.....	104
Figura 27. Cortes histológicos dos tumores de H358 desenvolvidos no subcutâneo de camundongos <i>nude</i> e tratados com os adenovírus AdLacZ (controle), Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53.....	105
Figura 28. Análise da expressão gênica dos transcritos de p16 e p53 nos tumores H358 após 72 horas de transdução com AdLacZ, Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53.....	106
Figura 29. Esquema simplificado do efeito <i>in vitro</i> de Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53 nas células H358.....	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação dos diferentes regimes de co-transdução realizados na linhagem H358.....	57
Tabela 2. Sequência dos <i>primers</i> utilizados no ensaio de PCR em tempo real...	61
Tabela 3. Ensaio realizado em camundongos BALB C/nude após administração com os vírus AdLacZ, Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53.....	62
Tabela 4. Identidade de restrição dos plasmídeos de entrada e adenovirais.....	66
Tabela 5. Valores e relações de títulos físico e biológico das produções adenovirais, expressos em VP/mL (<i>viral particles per ml</i>) e CPEU/mL (<i>cytophatic effect unit per ml</i>).....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

Ad	Adenovírus
ADA	<i>Adenosina Deaminase</i>
Adc	Adenocarcinoma
ARF	<i>Alternative Reading Frame</i>
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia Related</i>
CAR	<i>Coxsackie/Adenovirus Receptor</i>
CAK	<i>CDK-activating kinase</i>
CDK	<i>Cyclin-Dependent Kinase</i>
CDKI	<i>CDK-Inhibitor</i>
CMV	Citomegalovírus
CIP	<i>CDK- Interacting Protein</i>
CPEU	<i>Cytophatic Effect Unit</i>
C _T	<i>Threshold Cycle</i>
DISC	<i>Death-Inducing Signaling Complex</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>desoxiribonucleic acid</i>
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
eGFP	<i>enhanced Green Fluorescent Protein</i>
Egr-1	<i>Early Growth Response-1</i>
EMC	Encefalomiocardite
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorter</i>
FSC	<i>Forward Scatter Cell</i>
GADD45	<i>Growth Arrest and DNA damage gene</i>
HE	Hematoxilina-Eosina
HEK	<i>Human Embrionic Kidney</i>
IAP	<i>Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INK4	Inibidores de CDK4
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i>

ITR	<i>Inverted Terminal Repeat</i>
KIP	<i>Kinase-Interacting Protein</i>
LCC	<i>Large Carcinoma Cell</i>
MDM2	<i>Murine Double Minute 2</i>
MDM4	<i>Murine Double Minute 4</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
RNA _m	RNA mensageiro
MTS1	<i>Multiple Tumor Suppressor 1</i>
NPC	<i>Nuclear Pore Complex</i>
NSCLC	<i>Non-Small-Cell Lung Cancer</i>
ORI	Origem de replicação
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
pCL	vetor retroviral, resultado da fusão entre o promotor de CMV região 5'U3 da LTR de MoMuLV
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonylfluoride</i>
RCA	<i>Replication Competent Adenovirus</i>
RGD	<i>Arginina Glicina Ácido aspártico</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RT-PCR	<i>Reverse-Transcriptase Polimerase Chain Reaction</i>
SA-β-gal	<i>Senescence-Associated β-galactosidase</i>
SCLC	<i>Small-Cell Lung Cancer</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SqC	<i>Squamous cell carcinoma</i>
SSC	<i>Side Scatter Cell</i>
SV40	<i>Simian Virus 40</i>
SVV	<i>Survivin</i>
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TNF	<i>Tumour Necrosis Factor</i>
TRIS	<i>tris hydroxymethyl aminomethane</i>
TP	<i>Terminal Protein</i>
T-TBS	<i>Tween-Tris Buffer Saline</i>
TUNEL	<i>Terminal Deoxi-Ribonucleotidyl Transferase Mediated dUTP nick end</i>

Labelling

uPAR	<i>Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor</i>
VEGF	<i>Vascular Endotelial Cell Growth Factor</i>
VP	<i>Viral Particles</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1 Ciclo celular e os genes supressores de tumor p16 ^{INK4a} e p53.....	25
2.2 p53 e apoptose.....	30
2.3 Senescência celular.....	31
2.4 Câncer.....	32
2.5 Câncer de pulmão.....	34
2.6 Terapia gênica do câncer.....	35
2.7 Adenovírus como veículo para transferência gênica.....	36
2.7.1 Adenovírus.....	36
2.7.2 Vetores adenovirais.....	39
2.8 Elemento IRES - ferramenta para construção de vetores policitrônicos.....	42
3 OBJETIVOS.....	43
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1 Construção dos plasmídeos de entrada pENTR2ΔeGFP, pENTR2Δp16, pENTR2Δp53 e pENTR2Δp16IRESp53.....	44
4.2 Obtenção dos vetores adenovirais AdpeGFP, Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53.....	45
4.3 Terminologia em terapia gênica.....	46
4.4 Linhagens celulares e cultivo.....	48
4.5 Produção viral.....	49
4.6 Purificação da preparação viral em gradiente de cloreto de cério.....	50
4.7 Titulação viral física.....	50
4.8 Titulação viral biológica.....	51

4.9 Caracterização dos vetores adenovirais.....	51
4.9.1 Seqüenciamento dos cDNAs p16 e p53.....	51
4.9.2 Ensaio de PCR para verificação da presença de vírus competentes de replicação (RCA – <i>Replication competent virus</i>).....	52
4.9.3 Identificação dos transcritos p16 e p53 em células H358 transduzidas com Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53.....	52
4.9.4 <i>Western Blot</i> para as proteínas p16 e p53 na linhagem H358 transduzida com os vetores virais Adp16, Adp53, Adp16Ip53 e o reporter AdeGFP.....	53
4.9.5 Imunocitoquímica para as proteínas p16, p53, p21 e pRb na linhagem H358 transduzida com os vetores Adp16, Adp53, Adp16Ip53, Adp16+Adp53 e o reporter AdLacZ.....	54
4.9.6 Verificação da integridade funcional do gene p53 selvagem e conseqüente funcionalidade do elemento IRES na configuração bicistrônica Adp16IRESp53 e monocistrônica Adp53.....	55
4.10 Ensaaios funcionais <i>in vitro</i> nas linhagens H358 e A549 transduzidas com os vetores virais Adp16, Adp53, Adp16IRESp53 e os reporteres AdeGFP ou AdLacZ.....	56
4.10.1 Curva de crescimento na linhagem H358.....	56
4.10.2 Ciclo celular.....	56
4.10.3 Ensaio de co-transdução com Adp16 e Adp53 na linhagem H358.....	57
4.10.4 Ensaio de luciferase na linhagem H358.....	58
4.10.5 Tamanho e granulosidade celular na linhagem H358.....	58
4.10.6 Ensaio de senescência associada a β -galactosidase na linhagem H358.....	59
4.10.7 Ensaio de caspase-3 na linhagem H358.....	59
4.10.8 Ensaio de PCR em tempo real para identificação dos transcritos de p16, p53, p21, MDM2, Bax, SVV e FoxO em células H358 transduzidas com Adp16, Adp53, Adp16IRESp53.....	59
4.10.9 Morte celular na linhagem A549.....	61
4.11 Tratamentos dos tumores derivados de células H358 produzidos em camundongos <i>nude</i>	61
4.11.1 Administração dos vetores virais Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53 e o controle AdLacZ <i>in situ</i>	62

4.12 Análise estatística.....	64
4.12.1 Cálculos utilizados para análise dos resultados <i>in vivo</i>	64
5 RESULTADOS	66
5.1 Construção dos vetores adenovirais AdeGFP, Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53.....	66
5.2 Titulação e análise da presença de replication competent adenovírus (RCA) nas preparações dos adenovírus AdeGFP, Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53.....	67
5.3 Determinação de eficiência de transdução das células H358 derivadas de carcinoma de pulmão.....	72
5.4 Expressão dos transgenes p16 e p53 mediada pelos vírus Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53 na linhagem de carcinoma de pulmão H358.....	73
5.5 Avaliação da atividade funcional da proteína p53 como fator de transcrição quando expressa pelos vírus Adp53 e Adp16IRESp53.....	79
5.6 Inibição de E2F nas células H358 ^{Adp16} , H358 ^{Adp53} e H358 ^{Adp16IRESp53} como indicador indireto da ativação de pRb.....	80
5.7 Análises funcionais in vitro do efeito da reposição simultânea de p16 e p53 nas células H358 mediada pelo vírus Adp16IRESp53.....	84
5.7.1 Cinética de proliferação das células H358 ^{Adp16} , H358 ^{Adp53} e H358 ^{Adp16IRESp53}	84
5.7.2 Análise do ciclo nas células H358 ^{Adp16} , H358 ^{Adp53} e H358 ^{Adp16IRESp53}	84
5.7.3 Análise comparativa de transdução com vetor bicistrônico e co-transdução com vetores monocistrônicos: Adp16IRESp53 <i>versus</i> Adp16+Adp53.....	89
5.7.4 Alterações na morfologia e análise da senescência das células H358 ^{Adp16} , H358 ^{Adp53} e H358 ^{Adp16IRESp53}	92
5.7.5 Análise de apoptose nas células H358 ^{Adp16} , H358 ^{Adp53} e H358 ^{Adp16IRESp53}	92
5.7.6 Análise transcricional dos genes endógenos MDM2 e Bax nas células H358 após tratamento com os vetores adenovirais Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53.....	95
5.7.7 Análise do efeito dos vetores adenovirais Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53 no ciclo e morte celular na linhagem de adenocarcinoma pulmonar humano A549.....	98

5.8 Tratamento <i>in vivo (in situ)</i> dos tumores derivados de H358 com os vírus supressores de tumor Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53.....	100
6 DISCUSSÃO	107
6.1 Análise do efeito funcional da combinação bicistrônica Adp16IRESp53 em modelo de câncer pulmonar <i>in vitro</i>	108
6.2 Validação <i>in vivo</i> do efeito da configuração bicistrônica p16/p53 em tumores H358.....	115
7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	118
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
ANEXOS	135
ANEXO 1 Seqüências derivadas do ensaio de seqüenciamento realizado nos plasmídeos adenovirais pAdeGFP, pAdp16, pAdp53 e pAdp16IRESp53.....	135

1 INTRODUÇÃO

Câncer é consequência de múltiplas alterações genéticas. É uma doença heterogênea extremamente complexa, que abrange modificações fisiológicas, teciduais e celulares do organismo.

A manutenção do controle do ciclo celular é fundamental para evitar o aparecimento de tumores. A inativação de genes reguladores negativos da progressão celular e ativação de oncogenes são alguns dos eventos desencadeantes da tumorigênese. A perda das funções dos genes supressores de tumor p16^{INK4a} e p53 está presente na maioria dos carcinomas humanos (Sharpless, *et al.*, 2002).

Nas células normais, o complexo ciclina D-CDK4/6 fosforila a proteína pRb, que em seqüência, libera os fatores de transcrição E2F, necessários para ativação de genes relacionados com a fase S do ciclo celular. O gene p16^{INK4a} atua na interação com ciclina D, impedindo sua ligação com CDK4/6 (*Cyclin-Dependent Kinase 4/6*). O desarranjo nesse complexo mantém o estado hipofosforilado da proteína pRb e o controle da divisão celular.

Na ausência de condições tóxicas, o gene p53 está presente em níveis baixos. Na presença de danos no DNA, p53 é ativado e age como fator de transcrição promovendo parada do ciclo mitótico, senescência, apoptose, inibição da angiogênese e metástase. Esses efeitos dependem do tipo celular e são consequências de numerosas interações das diversas cascatas transducionais responsivas a p53 (Harris e Levine, 2005).

Costanzi-Strauss, 1998 demonstraram em linhagens de glioblastoma humano que um único gene supressor de tumor não é capaz de conter a proliferação descontrolada e que esse efeito é dependente do *background* genético presente em cada tipo celular verificado. Portanto, a utilização de dois ou mais genes supressores tumorais é suportado para análise do efeito funcional em modelos tumorais *in vitro* e *in vivo*. Nosso laboratório, com base na versatilidade do IRES (*Internal Ribosome Entry Site*), possui as construções bicistrônicas p16^{INK4a}+p21 e p16^{INK4a}+p53 na configuração retroviral pCL (Léo *et al.*, 2003; Muschellack *et al.*, 2003), um importante vetor capaz de suportar genes citotóxicos ou citotásticos (Naviaux *et al.*, 1996).

Este presente trabalho contempla pela primeira vez a utilização da combinação bicistrônica dos genes p16^{INK4a} e p53 no vetor adenoviral defectivo de replicação. Nosso modelo é a linhagem de carcinoma de células não-pequenas de pulmão humano H358 em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Algumas análises *in vitro* também foram obtidas com a linhagem de carcinoma de células não-pequenas de pulmão A549.

O trabalho iniciou-se com a construção e conseqüente produção dos vetores adenovirais AdeGFP, Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53. Como não inserimos marcador molecular nos vetores, utilizamos como referência da eficiência de transdução, a detecção do vírus AdeGFP nas células. A proteína GFP foi originalmente isolada da água-viva *Aequorea victoria* e desde sua descoberta em 1962, vem sendo amplamente utilizada como ferramenta da pesquisa em biologia celular e molecular (Remington, 2006).

Os resultados demonstraram uma grande superioridade na indução de morte celular com o vetor bicistrônico Adp16IRESp53 comparado aos monocistrônicos Adp16 e Adp53 na linhagem de carcinoma pulmonar H358. Adicionalmente, abordamos um pequeno perfil molecular da indução de genes endógenos após transdução com os vetores supressores de tumor através da técnica de PCR em tempo real. De um lado, avaliamos os genes de via de morte celular, de outro, verificamos alguns genes induzidos na resposta a sobrevivência da célula. O tratamento dos tumores nos camundongos *nude* também demonstrou eficácia dos vetores terapêuticos na estabilidade da proliferação tumoral. Neste trabalho apresentamos dados relevantes de inibição da proliferação celular em modelo de câncer pulmonar, e acreditamos que a combinação p16^{INK4a}+p53 possa no futuro, ser considerada em protocolos clínicos de terapia gênica do câncer.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ciclo celular e os genes supressores de tumor p16^{INK4a} e p53

A proliferação das células de mamíferos é mantida por um controle preciso do ciclo celular, que compreende as fases de síntese de DNA (S) e mitose(M), sendo separadas por dois intervalos: G1 e G2. Em conjunto, as fases G1, S e G2 são denominadas intérfase, na qual ocorrem os principais processos moleculares da divisão celular.

O mecanismo molecular que controla a progressão do ciclo celular se fundamenta na atividade seqüencial de famílias de quinases, conhecidas como CDKs: quinases dependentes de ciclina (Sherr e Roberts, 1999), as quais necessitam da subunidade regulatória ciclina para se ativarem.

A participação dos complexos CDKs-ciclinas ocorre quando as células quiescentes são estimuladas a entrarem em divisão, através de fatores de crescimentos externos. As primeiras CDKs a serem fosforiladas pela CAK (CDK-*Activating Kinase*) são as CDK4 e CDK6, que em associação com a ciclina D e p21^{WAF1} ou p27^{KIP1} e PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), direciona o progresso da fase G1 para S (Sherr e Roberts, 1999). No fim de G1 e início de S, em que os fatores externos não são mais necessários, os complexos ciclina E-CDK2 e ciclina A-CDK2 são ativados, desencadeando a replicação do DNA. Após o término da síntese, ciclina B-CDK1 conduz o ciclo à mitose (Serrano, 2000; Xiong, 1993).

A proteína pRb é central no controle do ciclo celular. Na forma não fosforilada ou hipofosforilada, pRb associa-se com vários fatores transcricionais, exercendo a função de inibir a divisão celular. Entre esses fatores, de grande relevância estão as proteínas E2Fs, que ativam a expressão de importantes genes relacionadas à progressão do ciclo como ciclinas E e A. E2F livre aumenta também a transcrição do seu próprio gene. Quando fosforilada pelo complexo quartenário CDK4/CDK6 - ciclina D - p21^{WAF1}/p27^{KIP1} - PCNA, pRb libera os fatores de transcrição E2F, dando seqüência a mais um ciclo de divisão celular (Kaelin, 1999).

A proteína pRb desempenha um papel fundamental nos primeiros dois terços de G1 do ciclo celular, e é neste período que as células fazem a maioria de suas decisões sobre proliferação e quiescência. A transição entre os estágios de

dependência de fatores de crescimento externos e independência é chamada de ponto de restrição (Weinberg, 1995; Pardee, 1974), que representa o não retorno depois que as células tornaram-se comprometidas com um novo estágio de replicação. O controle adequado desse mecanismo é essencial para a manutenção de níveis normais da proliferação celular (Ortega *et al.*, 2002).

Entre os reguladores negativos das CDKs, estão uma família de proteínas conhecidas como CDKIs (CDK *Inhibitors*), que compreendem duas famílias: INK4 (Inibidores de CDK4), composta de quatro membros: p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} e p19^{INK4d}, que especificamente inibem o complexo ciclina D/CDK4-6 (Ruas e Peters, 1998) e, a família CIP/KIP (CDK *Interacting Protein e Kinase Interacting*), composta de três membros: p21^{WAF1}, p27^{KIP1} e p57^{KIP2}, que inibem todos os complexos ciclinas-CDKs (Serrano, 2000).

O gene p16^{INK4a}, também chamado MTS1 (*Multiple Tumor Supressor 1*) está localizado no cromossomo 9p21 e foi identificado como potente inibidor de CDK4/6. Essa inibição impede o complexo ciclina D-CDK4/6 de fosforilar a proteína pRb, resultando em parada do ciclo celular em G1 (Serrano, 1993; Byeon, 1998). O gene p15^{INK4b} possui 44% de homologia nos primeiros 50 aminoácidos e 97% nos próximos 81 com p16^{INK4a} (Hunter e Pines, 1994). Foi demonstrado em camundongos, que p18^{INK4c} e p19^{INK4d} são expressos primeiramente durante desenvolvimento embrionário, enquanto p16^{INK4a} e p15^{INK4b} somente são detectados depois do nascimento na maioria dos tecidos (Zindy *et al.*, 1997).

A via de p53 representa outro mecanismo essencial de controle da proliferação celular. A proteína p53 foi inicialmente visualizada em associação com o antígeno *Large T*, pertencente ao *simian virus 40* – SV40, visualizada em linhagens celulares transformadas com esse vírus (Lane e Crawford, 1979; Linzer e Levine, 1979). O gene p53 foi descrito primeiramente como um proto-oncogene, em razão da observação de elevada quantidade de p53 em vários tipos de tumores. Mais tarde foi demonstrada sua ação como um supressor da transformação celular, ao descobrir que p53 selvagem inibiu a habilidade de E1A+Ras ou p53 mutante+oncogenes em transformar fibroblastos primários de embriões de ratos (Finlay, 1989). Conseqüentes trabalhos revelaram p53 como um fator de transcrição extremamente importante no controle da manutenção da integridade do genoma (Lane, 1992; El-Deiry *et al.*, 1993).

Diversos mecanismos compõem a funcionalidade e versatilidade de p53. As vias de ativação estão divididas em três principais categorias: 1- ativação através de danos no DNA incluindo, por exemplo, irradiação por UV e raios gama e reação com radicais livres oxidativos. Essa ativação depende de duas proteínas quinases, denominadas ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) e ChK2; 2- ativação por sinais oncogênicos, como a superexpressão dos proto-oncogenes Ras e Myc; nesse momento, a ativação de p53 depende da proteína p14^{ARF}; 3- ativação por drogas quimioterápicas, luz UV, dependentes da quinase ATR (*Ataxia Telangiectasia Related*). Todas essas vias inibem a degradação e permite a estabilização e modificações pós-traducionais da proteína p53, possibilitando sua ação de ativar a transcrição de diversos genes envolvidos em morte, inibição da divisão celular, angiogênese e metástase, senescência, entre outros (Levine *et al.*, 2006; Volgestein *et al.*, 2000). Outras funções de p53 envolvidas com regulação de danos no DNA incluem sua ativação na presença de deprivação de glicose e altos níveis de espécies reativas de oxigênio, direcionando um efeito de sobrevivência celular (Vousden e Lane, 2007). Adicionalmente a este tópico, o fator de transcrição FoxO (*the class O of Forkhead Box transcription factors*) é descrito como essencial nos processos de diferenciação, proliferação, metabolismo e resistência ao estresse. Ambos, p53 e FoxO induzem a diminuição da taxa glicolítica em resposta a falta de glicose e ativam a sobrevivência da célula. Na tumorigênese, a perda de ambos compromete o metabolismo celular, com aumento da taxa glicolítica. Desse modo, FoxO é considerado um gene supressor de tumor (Van der Horst e Burgeringm, 2007).

Os níveis de p53 são determinados principalmente pela sua taxa de ubiquitinação e subsequente degradação proteolítica no citoplasma. A ubiquitina central E3 é o produto do gene MDM2 (*Murine Double Minute 2*); em humanos HDM2 (*Human Double Minute 2*). Recentemente, também descrito como inibidor de p53, o gene MDM4 ou MDMX (Parant *et al.*, 2001). A regulação MDM2-p53 é do tipo retroalimentação negativa, em que atividade aumentada de p53 dirige a expressão de seu próprio regulador negativo. MDM2 é controlado pela proteína supressora tumoral p14^{ARF}, que bloqueia sua atividade, evitando a degradação proteolítica e aumentando a estabilidade de p53 (Fuster *et al.*, 2007). O gene p14^{ARF} (*Alternative Reading Frame*) é um produto alternativo de leitura do locus INK4, na qual pertence p16^{INK4a}, porém, apesar de pertencerem ao mesmo locus, os genes p16^{INK4a} e p14

possuem seus próprios promotores, cada qual produzindo um diferente transcrito: p14 formado pelos éxons 1 β , 2 e 3 e p16 pelos éxons 1 α , 2 e 3. A proteína p14^{ARF} age como um sensor de sinais hiperproliferativos originados de oncoproteínas e indutores de entrada na fase S, como Myc, E1A, Ras e E2F, direcionando a célula a apoptose dependente de p53 (Momand *et al.*, 1998; Sherr, 1998).

Na interrupção do ciclo celular, a proteína p53 ativa o CDKI p21^{WAF1}, que em altos títulos, induz a inibição dos complexos CDKs-ciclinas-PCNA. A subunidade da DNA polimerase δ , PCNA, está relacionada ao reparo do DNA. Com atividade da polimerase inibida, a síntese de DNA é inibida e o bloqueio do ciclo celular alcançado (Cazzalinni *et al.*, 2008). Além de p21^{WAF1}, p53 ativa os genes GADD45 e 14-3-3 σ , que inibem ciclina B e conseqüente parada da divisão celular (Taylor e Stark, 2001).

A figura 1 representa o esquema do controle do ciclo celular descrito.

Figura 1: Representação simplificada do controle do ciclo celular.
 Fosforilação: —●— Ativação: —→ Inibição: —|

2.2 p53 e apoptose

O termo morte celular programada foi introduzido em 1964 por Lockshin e Williams para descrever a eliminação regulada de células específicas durante a transformação do estágio larval para a fase adulta de mariposas. Somente em 1972, a palavra apoptose foi caracterizada para descrever modificações morfológicas comuns ao processo de destruição celular. As mudanças morfológicas que classicamente definem apoptose são condensação da cromatina e fragmentação nuclear, resultando na formação de corpos apoptóticos (Lockshin e Williams, 1964; Kerr *et al.*, 1972 apud Lincz, 1998).

Em apoptose, o gene p53 está envolvido nas vias extrínscica e intrínscica. Nessas duas vias, proteases específicas denominadas caspases clivam uma série de substratos que culminam na fragmentação do DNA e mudanças morfológicas típicas da apoptose. Caspases são uma família de proteases intracelulares que participam de uma cascata proteolítica onde cada caspase pode ativar ela mesma ou outras caspases. Elas são sintetizadas como pró-enzimas precursoras que serão posteriormente processadas para sua forma ativa através da clivagem de dois ou mais resíduos de aspartato. Os iniciadores da cascata são caspases 8 e 9, que ativam as efetoras da apoptose 3, 6 ou 7 (Crichton e Ryan, 2004).

A via extrínscica requer o reconhecimento de receptores de morte por seus ligantes na superfície da célula. Esses receptores são membros da super família TNF (*Tumour Necrosis Factor*), receptor CD95 (também conhecido como Fas) e TRAIL. Nessa via, p53 promove apoptose através da ativação de Fas, por exemplo, que através do domínio intracelular denominado DISC (*death-inducing signaling complex*) ativa caspase-8, que inicia o processo de ativação de caspases efetoras da apoptose. (Levine, 2006; Crichton e Ryan, 2004; Mehlen e Puisieux, 2006). A via intrínscica da apoptose envolve a mitocôndria e pode ser ativada por oncoproteínas, danos diretos no DNA, espécies reativas de oxigênio e hipóxia. O gene p53 desencadeia a apoptose ativando os genes pró-apoptóticos da família Bcl-2, que incluem Bax, Bak, Noxa e PUMA e, inibe as proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-X_L e IAPs (*Inhibitor of Apoptosis Protein*), dentre elas a proteína *survivin* (SVV) (Johnstone *et al.*, 2002; Crichton e Ryan, 2004). Bax e Bak, em condições normais estão presentes no citoplasma ou frouxamente aderidos a mitocôndria, quando

ativados na apoptose, translocam-se para a membrana mitocondrial e induzem a liberação de citocromo c, que participa diretamente da ativação proteolítica da caspase-3 através da caspase 9 com conseqüente morte celular (Youle e Strasser, 2008). Esses eventos são acompanhados pela translocação da fosfatidilserina para a membrana celular externa, que *in vivo*, facilitará o reconhecimento por macrófagos, resultando na eliminação das células mortas.

2.3 Senescência celular

Senescência celular foi primeiramente descrita como um processo que limita a proliferação de células normais. As células param de dividir, permanecem na fase G1 do ciclo, porém continuam metabolicamente ativas (Campisi e Fagana, 2007). Essa ativação é dada após perda do potencial proliferativo produzido pelo acúmulo de células duplicadas, em resposta ao encurtamento dos telômeros. A enzima telomerase é expressa na linhagem germinativa, no início da vida embrionária, pouco em adultos e na maioria das células tumorais. A expressão desta enzima é um mecanismo comum pelo qual as células estabilizam seus telômeros, evitando a senescência (Serrano, 2000; Chiu e Harley, 1997; Campisi, 2001). Além da senescência replicativa, descrito acima, esse evento também é estimulado em resposta a estresse oncogênico, que inclui como exemplo superexpressão de RAS, RAF e E2F (Krtolica e Campisi, 2002). Este processo depende de um número de vias que juntas, resultam em um permanente e irreversível bloqueio do ciclo celular (Serrano, 2000). Um gene relacionado com a senescência é p16^{INK4a}, que distingue dos outros membros da família por ser transcricionalmente regulado em resposta a senescência e estresse oncogênico. A perda deste gene resulta em imortalização celular, evidenciado pela elevada freqüência de inativação em linhagens celulares (Serrano, 2000; Loughran *et al.*, 1996). A senescência é um mecanismo supressor tumoral, pois depende da manutenção das vias pRb e p53, dois genes supressores de tumor comumente perdidos em tumores malignos. A participação de p53 está relacionado com o aumento da expressão de p21, que em conseqüência, previne a fosforilação e inativação de pRb (Sherr e Roberts, 1999).

Entretanto, Krtolica *et al.*, 2001 discutem o processo de senescência celular como um evento antagonista, no qual demonstraram que fibroblastos senescentes do estroma podem estimular a hiperproliferação e progressão a malignidade de células epiteliais pré-neoplásicas e neoplásicas *in vitro* e *in vivo*. No trabalho referido, é discutido que a senescência protege os organismos do câncer no início da vida, mas que promove a doença no período tardio da vida. Esse fenômeno pode estar relacionado com a teoria evolucionária da pleitropia antagonista, ou seja, genes que são selecionados para melhorar o estado saudável de organismos jovens podem ocasionar efeitos deletérios não selecionados em organismos velhos. As mudanças funcionais presentes nos fibroblastos senescentes, como parada da divisão celular e maior secreção de matriz extracelular, por exemplo, podem alterar o microambiente tecidual, causando maior impacto em organismos velhos em comparação com organismos jovens, em que a presença de células senescentes é rara.

2.4 Câncer

Câncer é uma doença multifatorial, que envolve diversas e acumuladas alterações genéticas e moleculares, direcionando a transformação de células normais em malignas. Em 2000, Hanahan e Weinberg definiram a identidade da maioria dos tipos de tumores em seis principais características: auto-suficiência em sinais de crescimento, não responsividade a sinais de anticrescimento, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese, invasão tecidual e metástase. Complementando esta caracterização, Rajaraman *et al.*, 2006 apontam dois novos conceitos da origem e desenvolvimento do câncer: 1- divisão mitótica de células normais com danos no DNA e, 2-células do câncer originam-se de células-tronco mutantes denominadas células-tronco do câncer, que se autopropagam com potencial proliferativo.

Whitfield *et al.*, (2006) sugerem uma assinatura da carcinogênese, onde demonstraram que 62% dos resultados de análise de *microarrays* de tumores de mama indicaram mutações em genes de controle do ciclo celular. Alterações nos genes reguladores do ciclo, pertencentes às vias pRb (p16^{INK4a}/ Ciclina D-CDK4/pRb) e p53 (p53/ p21^{WAF1}/p14^{ARF}/MDM2), são condições básicas para o

surgimento de tumores e fazem parte da história de vida da maioria das células alteradas, independente da idade ou tipo de tumor.(Sherr, 1999, 2000).

Na via pRb, os genes Rb e p16^{INK4a} exibem um recíproco padrão de alteração; os tumores que perderam a expressão de p16^{INK4a} permanece com a expressão de Rb e vice-versa. Entretanto, há tumores que permanecem com os dois genes e, nestes casos é freqüente encontrar superexpressão de CDK4 ou ciclina D1 (Ruas e Peters, 1998). O gene *pRb* é mutado em retinoblastomas, carcinomas de células pequenas de pulmão, carcinomas de bexiga e em muitos sarcomas (Horowitz, 1990). Mutações que inativam a função inibitória do gene p16^{INK4a} são associadas com melanoma familiar; deleções homozigóticas do locus INK4a ocorrem freqüentemente em gliomas (55%), carcinomas nasofaríngeos (40%), leucemias linfóides (30%), sarcomas e tumores de ovário e bexiga (Hall e Peters, 1996; Elledge e Harper, 1994; Sherr e Roberts, 1995) e mutações pontuais afetando exclusivamente p16^{INK4a} ocorre em câncer pancreático e melanomas. Há também, casos em que o gene p16^{INK4a} não é expresso devido a um efeito epigenético de hipermetilação do promotor, relatado em gliomas, cânceres de pulmão, cabeça e pescoço (Ruas e Peters, 1998; Merlo *et al.*, 1995).

O gene p53 é o mais freqüentemente mutado nos tumores humanos, afetando não somente a integridade celular e conseqüente desenvolvimento do tumor, como também, contribuindo para a resistência a múltiplas drogas quimioterápicas e tratamento radioterápico (Johnstone *et al.*, 2002; Nigro *et al.*, 1989; Levine *et al.*, 1991; Hollstein *et al.*, 1991, 1994; Greenblatt *et al.*, 1994). Diferente de outros genes supressores tumorais que são inativados por mutações que levam ao desaparecimento do produto gênico, quase 80% das mutações em p53 são do tipo *missense*, com conseqüente síntese de uma proteína estável, mas com perda da capacidade transcricional. O efeito desse acúmulo em células tumorais é o aumento do potencial metastático, observado em modelos animais comparado com camundongos p53-*null*. Outros efeitos estão relacionados com dois genes da família de p53: p63 e p73. São genes que cooperam com p53 na ativação da apoptose e, que podem ser inativados por alguns mutantes de p53, resultando na perda da função supressora tumoral (Vousden e Lane, 2007; Soussi, 2007).

Na tentativa de responder se a inativação de genes supressores de tumor é essencial para a manutenção do câncer, recentemente Ventura *et al.*, 2007 demonstraram que a reativação endógena do gene p53 em camundongo foi capaz

de suprimir linfomas e sarcomas sem afetar tecidos normais; por conseguinte, alterações nas vias de controle do ciclo celular com a inativação de genes supressores de tumor são fundamentais para o início e continuidade de todo o processo tumorigênico.

2.5 Câncer de pulmão

Carcinoma de pulmão é o tumor que acomete o maior número de pessoas no mundo. Segundo o INCA, a estimativa de incidência em 2008 para este tipo de câncer no Brasil é de 27,270 casos, incluindo homens e mulheres.

Câncer de pulmão é o quarto tipo de câncer mais comum, depois de pele, próstata e mama. Em 85 – 90% dos casos, o câncer de pulmão é causado após longas exposições ao cigarro, elevando em 15% o risco do desenvolvimento do tumor em comparação com não fumantes. O risco aumenta proporcional ao número de cigarros por dia e ao tempo de exposição aos compostos nocivos. As mudanças histológicas observadas são proliferação do epitélio bronquial, perda dos cílios e presença de células atípicas (Kelley e Bruce, 2001).

Câncer de pulmão é dividido em quatro principais tipos histológicos: Adenocarcinoma (Adc), carcinoma de células escamosas (SqC), carcinoma de células grandes (LCC) e pequenas (SCLC). O termo câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC) é usado para AdC, SqC e LCC juntos, quando apresentam características biológicas e clínicas similares (Yokota e Kohno, 2004).

Estudos citogenéticos e moleculares revelam que múltiplos genes supressores de tumor estão envolvidos na carcinogênese pulmonar. É estimado que entre 10 – 20 mutações genéticas, duas estão envolvidas com inativação dos genes supressores de tumor (Ihde e Minna, 1991; Toloza, 2000). Dentre os genes mais freqüentemente alterados em câncer de pulmão, mutações em p53 e p16 estão presentes em 50% e 70% em NSCLC, respectivamente. Mutações em p53 são detectadas em lesões pré-neoplásicas no pulmão, com função adicional na progressão para neoplasia e conseqüente aquisição de novas alterações genéticas. Defeitos nas vias pRb e p53 são comuns em qualquer tipo histológico de câncer pulmonar e está relacionado com um pobre prognóstico (Kohno e Yokota, 1999).

2.6 Terapia gênica do câncer

A falta de entendimento do câncer em sua totalidade, devido às complexas interações entre o tumor e seu microambiente, torna-o alvo de pesquisa em busca de terapias alternativas.

A transferência de genes ausentes e/ou defeituosos em células alvo, com o objetivo de curar ou amenizar o progresso de uma doença é o conceito definido para terapia gênica (Verma e Weitzman, 2005). É uma estratégia de inovação biomédica e biotecnológica, que data de 1990 com a utilização do retrovírus carregando uma cópia normal do gene ADA (adenosina deaminase), perdido na doença imunodeficiência combinada severa ligada ao X (ADA-X-SCID). Nesse tratamento, foi possível atingir um benefício clínico, sem efeitos colaterais associados ao vetor retroviral (Costanzi-Strauss e Strauss, 2002; Strauss e Costanzi-Strauss, 2007).

A terapia gênica é esperança de cura para diversas malignidades. Em câncer, está envolvida em três principais categorias: imunoterapia, viroterapia oncolítica e transferência gênica (Cross e Burmester, 2006). A imunoterapia utiliza as técnicas da terapia gênica para melhorar a eficácia do tradicional tratamento de ativação do sistema imunológico contra o câncer, com o uso de vacinas recombinantes. Em geral, o tratamento consiste na imuno estimulação provocada por células doentes do próprio paciente que expressem os genes codificantes de citocinas ou de proteínas altamente antigênicas (Kowalczyk *et al.*, 2003).

A terapia oncolítica consiste de vetores adenovirais com especificidade para células tumorais. Esses vetores se replicam condicionalmente com o objetivo de ultrapassar os limites da baixa eficiência de transdução *in vivo* impostos por vetores defectivos de replicação e deste modo, potencializar a distribuição dos vírus no tumor. Protocolos clínicos demonstram algum sucesso com o uso do adenovírus ONYX-015. Por não possuir a proteína viral E1B, esse vírus está direcionado para a replicação e conseqüente lise das células tumorais deficientes em p53. Em células normais, esses vírus não são capazes de se replicar (Bischoff *et al.*, 1996). ONYX-015 foi testado em protocolos clínicos em fase II e II de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e resultou na regressão do tumor de acordo com a funcionalidade de p53 (Nemunaitis *et al.*, 2000). Finalmente, a terapia gênica do câncer também é aplicada com a transferência de genes supressores de tumor,

genes suicidas e anti-angiogênicos através de diversos vetores virais que, em geral, são defectivos de replicação. Com a utilização de genes como p53 e timidina quinase em carcinoma de cabeça e pescoço e glioblastoma respectivamente, são relatados dados de sobrevida e regressão tumoral dos pacientes em protocolos clínicos de diferentes fases. Em terapia gênica do câncer de pulmão, os protocolos clínicos aprovados estão direcionados para o uso de genes supressores de tumor, genes suicidas, vacinas tumorais conduzindo citocinas, além da combinação com os tratamentos convencionais de radio e quimioterapias. O primeiro protocolo aprovado para NSCLC avançado foi registrado em 1995 com o uso de retrovírus carreando p53. O vírus foi diretamente injetado intratumoral em um total de nove pacientes; sete deles mostraram regressão tumoral e um demonstrou inviabilidade tumoral após três meses do tratamento (Cross e Burmester, 2006).

2.7 Adenovírus como veículo para transferência gênica

2.7.1 Adenovírus

Os adenovírus pertencem à família *Adenoviridae*, consistindo em mais de 50 sorotipos. Foram primeiramente isolados em 1953 em culturas de células adenóides humanas e, mais tarde constatados que, além de causar doença respiratória, também provoca conjuntivites e gastroenterites infantis (Rowe *et al.*, 1953 apud Shenk, 2001).

Os adenovírus possuem uma estrutura complexa, com um formato icosaédrico não envelopado. As proteínas principais do capsídeo são os *hexons* e *pentons*. Destes *hexons*, saem 12 vértices, denominadas fibras protéicas que são constituídas principalmente da base *penton* e *knob* (Figura 2), este último, responsável pela adesão à célula. (Shenk, 2001). O genoma consiste de um DNA dupla fita linear de 36 Kb com seqüências no final de cada fita de repetidas terminações invertidas (ITRs), que irão atuar no correto empacotamento do genoma viral.

A entrada do vírus na célula depende de uma alta afinidade entre o *knob* e um receptor denominado CAR (*Coxsackie/Adenovirus Receptor*), sendo comum para os

Coxsackievirus e Adenovirus (Bergelson *et al.*, 1997). É uma proteína de 46KDa, com domínios citoplasmáticos e transmembranares.

Há diversas variações na adesão entre o vírus e receptor. Por exemplo, o sorotipo 41, subgrupo F possui duas fibras de diferentes comprimentos, sendo um deles que se liga ao CAR. Algumas células não possuem CAR em suas membranas plasmáticas; dentre elas, estão as de origem hematopoiética e diversas células tumorais (Mentel *et al.*, 1997). Uma das possibilidades de contornar este problema é modificar o tropismo adenoviral, alterando o gene da fibra *knob*, por troca do gene inteiro ou pela construção de quimeras entre receptores de sorotipos diferentes (Gall *et al.*, 1996; Stone e Lieber, 2006).

Figura 2: Adenovírus selvagem. Representação de sua forma icosaédrica e proteínas principais.

Em vermelho os *hexons*, em preto a base *penton* de onde saem as fibras protéicas. Em amarelo, a porção *knob*, responsável pela adesão às células permissíveis.

Fonte: *Q-Bio gene* em www.pacisa-giralt.com/cards/_rct/a/0018.jpg. Acesso: 2007 maio 03.

Após a adesão da fibra *knob* com o receptor, a entrada do vírus por endocitose é mediada por clatrin, que são proteínas aderidas à vesícula de formação endocítica. Neste processo é necessário uma sequência de aminoácidos Arginina-Glicina-Ácido aspártico (RGD) pertencente à base *penton*, que facilita a interação com α -v integrinas, importantes na internalização do adenovírus (Stewart *et al.*, 1997). Após a internalização, o vírus é desagrupado, ocorrendo lise endossomal. O DNA viral é então transportado para o núcleo através de microtúbulos e de proteínas complexadas com o DNA viral: TP (*Terminal Protein*), VII e V e o peptídeo *mu*. Estas se associam com a proteína p32, que participa do

sistema de transporte celular e, no núcleo os processos de replicação, transcrição e tradução dos genes virais são iniciados (Kanerva e Hemminki, 2004; Matthews e Russel, 1998). O tempo total desde a entrada do vírus até o transporte do DNA viral ao núcleo é de 30-60 minutos, como ilustrado com maiores detalhes na figura 3 (Campos e Barry, 2007).

A transcrição adenoviral é dividida em dois eventos: inicial e tardio; anterior e posterior a replicação viral, respectivamente. O evento inicial é representado pelos genes E1A, E1B, E2A, E2B, E3 e E4.

O produto do gene *E1A* está envolvido com a replicação do DNA viral e de diversos processos da divisão celular, podendo direcionar os padrões da transcrição celular para a transcrição viral e estimulando a célula hospedeira a entrar na fase S (Russel, 2000; White *et al.*, 1991). O produto do gene E1B age na continuação da sobrevivência celular. Os produtos dos genes E2A e E2B também participam da replicação e da transcrição dos genes tardios. Já os produtos do gene E3 não são requeridos para a replicação, mas como função importante de proteção viral, um produto do gene E3 com 19kDa impede que o vírus seja reconhecido pelo MHC classe I de cadeia pesada se ligando a ele. O produto do gene E4 auxilia também no processo de replicação, isolando a síntese protéica do hospedeiro e também atuando com E1B 55k na ligação e liberação do gene p53 para ser degradado (Han *et al.*, 1996; Bennett *et al.*, 1999).

O evento tardio ocorre com a expressão dos genes L1, L2, L3, L4 e L5, que irá codificar as proteínas estruturais já mencionadas – *penton*, *hexon* e fibra (Chuah, 2003). Após o *capping* e poliadenilação, os RNAs mensageiros são formados por *splicing*. Além da produção das proteínas estruturais, ocorre a encapsidação e maturação das partículas virais (Hearing *et al.*, 1987). A montagem do vírus ocorre no núcleo, sendo liberado da célula por lise da mesma (Shenk, 2001).

Figura 3: Vias de interação e condução do Ad5 na célula hospedeira: Inicial adesão mediada pela interação fibra-CAR. Em seguida, ligação de motivos RGD da base *penton* a integrinas, resultando nas cascatas de eventos celulares que conduzem o DNA viral ao núcleo celular. Esses eventos incluem a acidificação endossomal para liberação do capsídeo viral, interação com a proteína citoplasmática dineína, microtúbulos e complexo do poro nuclear (NPC) para importação do genoma ao núcleo da célula hospedeira.
Fonte: Modificado de Campos e Barry, 2007.

2.7.2 Vetores adenovirais

Os vetores adenovirais foram os primeiros condutores de genes exógenos desenvolvidos. Sua descoberta baseou-se na observação da presença do *simian virus 40* (SV40) em vacinas adenovirais propagadas em linhagens celulares de macaco. Após a eliminação da contaminação dos estoques da vacina, foi constatado que o antígeno T, derivado do SV40 tinha recombinado com a região E3 do genoma adenoviral, demonstrando assim, a possibilidade do adenovírus carrear genes exógenos (Campos e Barry, 2007).

O vetor adenoviral é utilizado como veículo de entrega dos genes de interesse em muitos estudos para vários tipos de doenças, como o câncer e outras

malignidades genéticas. Com vantagens importantes, como a habilidade de transduzir células mitóticas e pós-mitóticas em diferentes tipos celulares e produção com alto título os fazem participar de muitos protocolos clínicos (Figura 4).

Figura 4: Gráfico demonstrando a utilização dos principais vetores em protocolos de terapia gênica. Dados extraídos do *The Journal of Medicine* in www.wiley.co.uk/wileychi/genmed/clinical. Acesso: 2008 abr 07

Além das vantagens citadas, os adenovírus recombinantes possuem desvantagens consideráveis, sendo a mais preocupante o fato do vírus causar uma forte resposta imunológica contra o hospedeiro.

Os adenovírus defectivos de replicação, utilizados em ensaios de transferência gênica são classificados em vírus de primeira, segunda, terceira/quarta gerações, sendo construídos com o objetivo de amenizar a resposta imunológica e aumentar o tempo de expressão do transgene. Uma característica do vírus é que o gene a ser entregue não se integra no genoma, fica no núcleo na forma episomal, por isso sua expressão é transiente, pois a diminuição dessa expressão ocorre cada vez que a célula se divide. Os vírus de primeira geração são caracterizados pela retirada do gene E1A completo e parte do gene E1B, dos genes E1 e /ou E3, portanto, defectivos de replicação com capacidade de inserção de DNA exógeno de mais de 6,5kb. Neste caso, a remoção da região E1 impede que ocorra a

transcrição dos genes E2, que são dependentes de E1. Para a produção, é necessária uma linhagem celular que contenha algum gene essencial de replicação do DNA viral, como é o caso da linhagem 293 HEK (*Human Embryonic Kidney*), que possuem os genes E1A e E1B inserido em seu genoma (Graham *et al.*, 1977). Desta forma, no momento da transfecção do DNA viral nessa linhagem, ocorre o fornecimento dos genes em *trans*. Estes vetores de primeira geração, como mencionado, estimulam uma forte resposta imunológica e a expressão do DNA de interesse é de curta duração (Russel, 2000; Kozarsky e Wilson, 1993).

No vírus de segunda geração, os vetores são defectivos nos genes E1/E2A, E1/E4, em alguns ou todos os genes E2 (Lusky *et al.*, 1998; Moorhead *et al.*, 1999; Chuah *et al.*, 2003). Para a produção, como os de primeira geração, é necessária alguma linhagem que forneça os genes ausentes para o vírus. Os vetores de terceira/quarta gerações, também chamados *gutless*, são desprovidos de todos os genes adenovirais e necessitam de um vírus *helper* e novamente de uma linhagem empacotadora para serem produzidos. Além disso, estes vetores podem acomodar grandes tamanhos do DNA de interesse (Chuah, 2003).

Apesar de muitos estudos de transferência gênica serem realizados com adenovírus do tipo 5 e 2, outros sorotipos e quimeras entre sorotipos diferentes humanos e não humanos também são amplamente aplicados, com o objetivo de aumentar o espectro de transdução para tipos celulares refratários para Ad5 e/ou Ad2 e diminuir o nível de toxicidade no organismo provocado por esses sorotipos comuns (Stone e Lieber, 2006).

2.8 Elemento IRES - ferramenta para construção de vetores policistrônicos

Para viabilizar a expressão de dois ou mais genes distintos em um mesmo vetor com um único promotor, uma estratégia viável é a utilização do elemento IRES (*Internal Ribosome Entry Site*).

O IRES ocorre naturalmente em procariotos e alguns vírus, como encefalomiocardite, poliovírus, vírus da Hepatite C, A entre outros, inclusive em células eucarióticas. (Borman *et al.*, 1997; de Felipe, 2002). Em picornavírus, um segmento da região 5' não traduzida do RNAm viral promove a entrada no ribossomo celular independente do *capping* (Jang *et al.*, 1990). É um sistema muito eficiente, pois age de um modo independente do CAP para iniciar a tradução. Vetores bicistrônicos contêm dois cístrons interligados pelo IRES. O primeiro é traduzido CAP dependente e o segundo é IRES dependente, sendo co-expressos em uma única unidade de transcrição (Davies e Kaufman, 1992).

Há quatro trabalhos descritos na literatura que utilizaram adenovírus bicistrônico contendo genes supressores tumorais intermediado pelo elemento IRES. O primeiro deles é a verificação da importância da inativação de ambos os alelos de p53 para o desenvolvimento tumoral, através de ensaios realizados com um vetor de expressão plasmideal bicistrônico contendo p53 na versão selvagem e mutante. Resultados *in vitro* indicaram que, p53 mutado foi incapaz de inibir completamente a função de controle da proliferação celular de p53 selvagem (Frebourg *et al.*, 1994). O segundo é o trabalho de supressão da proliferação de células derivadas de glioblastoma mediado pelo adenovírus contendo seqüências uPAR (*Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor*) *antisense*, e o gene supressor de tumor p16 *sense*. *Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor* participa da invasão da célula tumoral, degradando as proteínas da matriz extracelular e ativando fatores de crescimento (Adachi *et al.*, 2002). Em 2003, o trabalho com o adenovírus bicistrônico p14^{ARF}/p53 demonstrou a superioridade da combinação em induzir apoptose e aumentar a tradução e estabilidade da proteína p53 em linhagem de câncer de cólon humano (Huang *et al.*, 2003). Mais recente Benitez *et al.*, 2007 demonstraram a combinação dos genes gas1 e p53 na indução de apoptose e parada do ciclo celular em linhagens de glioma C6 e U373.

3 OBJETIVOS

Considerando o conhecimento de que câncer é produto do acúmulo de mutações e a combinação de perda funcional de p53 e p16^{INK4a} é o evento mais comum nos carcinomas, nós elaboramos a hipótese de que a remediação combinada de p16^{INK4a} e p53 é necessária para a inibição da proliferação das células tumorais. Para atingir o nosso objetivo as seguintes etapas foram realizadas:

- Construção e produção do adenovírus bicistrônico Adp16IRESp53 e dos adenovírus monocistrônicos: Adp16, Adp53 e AdeGFP;
- Análise funcional *in vitro* (cultura de células) do efeito da remediação simultânea dos genes supressores de tumor p16^{INK4a} e p53, mediada pelo arranjo bicistrônico, sobre o sistema de controle do ciclo celular, incluindo divisão mitótica, senescência e apoptose;
- Estudos comparativos entre o tratamento *in vitro* com Adp16IRESp53 e tratamento via co-transução com Adp16 + Adp53;
- Tratamento *in vivo* - *in situ* dos tumores de H358 (derivado de células de carcinoma de pulmão humano - fenótipo p16⁻/p53⁻) com adenovírus Adp16IRESp53, Adp16, Adp53 e AdLacZ.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Construção dos plasmídeos de entrada pENTR2BΔeGFP, pENTR2BΔp16, pENTR2BΔp53, pENTR2BΔp16IRESp53

O trabalho iniciou-se com a construção dos vetores monocistrônicos AdeGFP, Adp16, Adp53 e o bicistrônico Adp16IRESp53. Para tanto, foi utilizado o sistema *Gateway* (Invitrogen), onde os cDNAs foram clonados no plasmídeo de entrada pENTR2BΔ e após recombinação sítio específica *in vitro*, transferidos para o plasmídeo adenoviral.

A construção desses vetores foi de acordo com a descrição a seguir. O plasmídeo pENTR2B original possui um gene de seleção denominado *ccdB*, específico para replicação em bactérias da cepa DB3.1 (Invitrogen). Optamos por retirar o gene *ccdB*, que permitiu a propagação do vetor em bactérias da cepa DH5α. Após digestão com a enzima EcoRI (Amersham Biosciences Corp. NJ-USA), foi gerado o pENTR2BΔ.

A seguir, o vetor pCLeGFPSN (Construído por Dr. Bryan Eric Strauss), foi digerido com a enzima BamHI (Invitrogen) e transferido para o mesmo sítio de pENTR2BΔ, denominando pENTR2BΔeGFP. Para a construção do pENTR2BΔp53, o vetor pCLp53SN (Léo *et al.*, 2003), foi digerido com BamHI e transferido para o mesmo sítio de pENTR2BΔ.

Na construção do pENTR2BΔp16, o vetor pCLp16IRESp53SN (Léo *et al.*, 2003) foi digerido com as enzimas EcoRI e XhoI (Amersham Biosciences Corp. NJ-USA) e o cDNA de p16 transferido para os mesmos sítios de pENTR2BΔ.

Para a clonagem do bicistrônico, o vetor pENTR2BΔp16 foi digerido com a enzima XhoI (Invitrogen). O inserto IRESp53 foi retirado do pCLp16IRESp53SN com a enzima BamHI. Vetor e inserto foram tratados com T4 polimerase para formação das extremidades *blunt*. Após obtenção do clone *antisense*, constatamos a criação de um sítio de XhoI na posição da enzima BamHI. Agora o sítio de XhoI, que pertence ao *polilinker* de pENTR2BΔp16 foi utilizado para inserção do cassete IRESp53. As figuras 5A e 5B representam os esquemas de clonagens realizados.

O protocolo geral de clonagem foi de acordo com Sambrook, 1989. Os insertos foram isolados e purificados com o sistema de purificação *Concert rapid gel extraction system* (Gibco-Life technologies) e posteriormente ligados aos plasmídeos de interesse com a enzima T4 DNA *ligase* (Invitrogen), seguido de transformação em bactérias *E.coli* DH5 α , selecionados por MINIPREP e os positivos mantidos à -20°C em preparações de MIDIPREP (SNAP MidiPrep - Invitrogen).

4.2 Obtenção dos vetores adenovirais: AdeGFP, Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53

A próxima etapa foi transferir os cDNAs eGFP, p16, p53 e o cassete p16IRESp53 para o plasmídeo adenoviral pAddestCMV– Sistema Gateway (Invitrogen) por recombinação sítio específica *in vitro*. Essa recombinação ocorre através dos sítios presentes nos plasmídeos de entrada e adenoviral, denominados attL1-attL2 e attR1-attR2, respectivamente. Os sítios de DNA *att* são formados por interações específicas que envolvem proteínas e 15 sítios de ligação (Richet *et al.*, 1986). Essa interação resulta na recombinação entre os sítios virais e bacteriano attP e attB respectivamente, gerando attL e attR, portanto, híbridos entre os atts iniciais. Desta forma, a recombinação entre attL e attR regenera os anteriores. A troca de fitas segue o modelo *Holliday*, dado por recombinação sítio específica (Landy, 1989).

O protocolo de recombinação *in vitro* foi seguido de acordo com instrução do fabricante. Resumidamente, a reação foi feita com 300ng de cada vetor a 25°C por 18 horas, seguido de transformação em bactérias *E.coli* DH5 α .

4.3 Terminologia em terapia gênica

As técnicas envolvidas na entrega do gene exógeno incluem métodos virais, com a utilização principalmente dos retrovírus, adenovírus e lentivírus e não virais, que consiste da entrega do DNA por injeção, lipossomos, nanopartículas (Verma e Weitzman, 2005).

Na tentativa de padronizar os conceitos nos campos da terapia gênica e virologia de vetores, os seguintes termos foram definidos: (Debyser, 2003).

- 1) Transformação: transferência de DNA plasmideal em bactéria;
- 2) Transfecção: transferência de DNA plasmideal em células eucarióticas através de métodos químicos;
- 3) Transdução: transferência gênica realizada por vetores virais defectivos de replicação em células eucarióticas;
- 4) Infecção: transferência gênica mediada por vírus.

Adicionalmente, vale ressaltar uma terminologia amplamente utilizada em experimentos de transferência gênica. O termo MOI (*Multiplicity of Infection*) é definido como a quantidade de vírus necessária para transduzir e /ou infectar uma célula; foi utilizada pela virologia pela primeira vez há aproximadamente sessenta anos, onde se desejou quantificar o número médio de fagos T4 infectando cada bactéria numa dada suspensão celular. Dessa medida indireta, assumiu-se que todos os vírus foram infecciosos e que todas as células foram susceptíveis, ignorando os efeitos físicos ou quaisquer outros que possam ser considerados quando se trata de uma suspensão coloidal. (Shabram e Aguilar-Cordova, 2000).

Figura 5: Esquema representativo da obtenção dos plasmídeos de entrada e vetores adenovirais (Sistema Gateway). A: cDNAs eGFP, p16 e p53 isolados dos vetores retrovirais pCLeGFP, pCLp16IRESp53SN e pCLp53SN, respectivamente, foram clonados nos plasmídeos de entrada pENTR2BΔ, utilizando os sítios de restrição indicados na figura. Os plasmídeos adenovirais pAdeGFP, pAdp16 e pAdp53 foram obtidos após recombinação sítio específica entre os sítios attL (pENTR2BΔ) e attR (plasmídeo adenoviral), B: Esquema representativo da obtenção do plasmídeo de entrada e vetor adenoviral bicistrônico. a e b: Vetor parental pCLp16IRESp53SN e pENTRY2BΔp16 digeridos com BamHI e XhoI, respectivamente. Cassete IRESp53 clonado a partir de ligação *blunt-end*, obtendo na versão *antisense* sítio de XhoI; Obtenção do pENTR2BΔp16IRESp53, versão *sense*, através dos sítios de XhoI. D: Após recombinação sítio específica entre os sítios attL (pENTR2BΔ) e attR (plasmídeo adenoviral), pAdp16IRESp53 foi obtido.

4.4 Linhagens celulares e cultivo

Todas as linhagens utilizadas foram mantidas no meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Invitrogen) suplementado com 10% de soro bovino fetal Cutilab (SP – Brasil), 10 U/mL de penicilina e 10 µg/mL de estreptomicina. As linhagens foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 2-3 dias. As culturas foram subcultivadas utilizando tratamento com solução de tripsina 0,1% e EDTA 1mM em PBS.

-293A (Invitrogen) - Linhagem produtora de vírus 293 A, derivada da linhagem parental 293, células de rim embrionário humano imortalizadas com adenovírus tipo 5 (Graham *et al.*, 1977). Os genes codificados pela região E1 do adenovírus (E1A e E1B) são expressos na linhagem 293 A, o que permite a replicação adenoviral, pois complementam a região E1 deletada dos adenovírus recombinantes defectivos de replicação.

-NCI-H358 (ATCC: CRL-5807) - Linhagem derivada de carcinoma bronquioalveolar humano (NSCLC), com o fenótipo pRb⁺/p16^{met}/p53⁻/p14⁻ (Ling *et al.*, 2003; Eymin *et al.*, 2003).

-A549 (ATCC: CCL-185) - Linhagem derivada de carcinoma pulmonar humano (NSCLC), fenótipo: pRb⁺/p16⁻/p53⁺/MDM2⁺ (Deng *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2003).

4.5 Produção viral

Antes de iniciar a transfecção, os vetores foram digeridos com a enzima *PacI* (*New England-Biolabs*) e purificados com Clorofórmio/Fenol. A digestão libera o gene de resistência a antibiótico e a origem de replicação (ORI) em bactérias que é fundamental para o correto empacotamento viral na linhagem 293 A.

A transfecção foi feita segundo protocolo do sistema de expressão adenoviral *ViraPower* (Invitrogen), com apenas a modificação da utilização de 3µg de cada vetor digerido. As células foram coletadas após visualização do efeito citopático. Esse efeito caracteriza-se pela presença de células levemente aderidas e arredondadas, sem excesso de morte celular, pois os adenovírus ainda estão dentro da célula.

O sistema *Virapower* utilizado para produção adenoviral consiste de três etapas: 1) Transfecção: transfecção e coleta do extrato bruto de adenovírus após visualização do efeito citopático; 2) Primeira amplificação: essa etapa é necessária para aumentar a quantidade de vírus antes da etapa de purificação; 100µL do extrato bruto vírus foram utilizados para infecção nas células 293 A; 3) Produção de vírus para etapa de purificação adenoviral: nesta última etapa, 50 placas de 100mm foram utilizadas para cada produção viral, contendo $2,5 \times 10^6$ células 293 A/placa. No dia seguinte, as células foram infectadas (MOI 5) com os vírus da 1ª amplificação AdLacZ, AdeGFP, Adp16, Adp53 ou Adp16IRESp53, em 2 mL de meio de cultivo, suplementado com 5% soro fetal bovino. As placas foram inclinadas (agitação moderada) de 15 em 15 minutos por 3 horas antes de completar com meio de cultivo para 10 mL. Após visualização do efeito citopático, 36-48 horas após a infecção, as células foram coletadas e centrifugadas por 10 minutos a 2500rpm. O meio foi aspirado, as células ressuspensas em 17 mL de PBS e armazenadas em freezer – 70 °C. Posteriormente, para liberação dos vírus, as células foram lisadas por 5 ciclos de congelamento (30 minutos –70 °C) e descongelamento (15 minutos a 37 °C), centrifugadas por 10 minutos a 2500rpm e o sobrenadante foi coletado e armazenado a –70 °C.

4.6 Purificação da preparação viral em Gradiente de Cloreto de Césio

Este procedimento foi de acordo com manual da *Q-BIO gene* – Adeno vator e o protocolo de produção viral de www.ncifcrf.gov/rtp/GEL/RAGP com modificações. Esta etapa consistiu de duas centrifugações. A primeira chamada de gradiente descontínuo separa os vírus dos debris celulares e de vírus não viáveis. A segunda, gradiente contínuo, separa definitivamente a banda de vírus viáveis da não viáveis.

No tubo 25x 89mm (Beckman), foram adicionados nessa ordem: 8 mL de Cloreto de Césio de densidade 1.4, 6 mL de Cloreto de Césio de densidade 1.2 e o volume do lisado viral, com cuidado, para a correta formação das densidades. Este tubo foi centrifugado em ultracentrífuga (Depto de Parasitologia, ICB-USP) em rotor SW28 por 90 minutos, 4°C, 23000 rpm. Após a centrifugação, a banda viral foi retirada com agulha 18G cuidadosamente abaixo da banda de vírus não viáveis. O conteúdo foi dispensado em outro tubo de centrifugação 16x76mm (Beckman), coberto com Cloreto de Césio de densidade 1.33 e centrifugado por 18h, 15°C, 46000rpm utilizando o rotor Ti70W. Em seguida, a banda foi retirada com agulha 19G (aproximadamente 1 mL) e dispensada na membrana de diálise (*Pierce Slide A Lyser* - Synapse). Esta diálise foi feita em tampão Tris-HCl pH8,0 10mM, MgCl₂ 2mM e sacarose 5% previamente filtrado em poro de 0,22 µm por 4h, 4°C sob agitação, trocando o tampão de hora em hora. Após a diálise, os vírus foram aliquotados e armazenados a -70 °C.

4.7 Titulação viral física

50 µl de vírus purificado foram adicionados em 50µl de SDS 1% e mantidos à temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, o volume foi completado para 500 µL com o tampão de diálise mencionado acima. A densidade óptica foi medida a 260 nm, onde uma unidade de densidade óptica corresponde a 1.1×10^{12} partículas virais.

4.8 Titulação viral biológica

O ensaio de efeito citopático foi avaliado de acordo com Nyberg-Hoffman *et al.*, 1997. Dez mil células 293A foram plaqueadas em bandeja de 96 poços. No dia seguinte, as células foram infectadas com os vírus em diluições seriadas de 10^{-9} a 10^{-12} nas colunas de 1 a 4 respectivamente em um volume de 50µl de meio de cultivo contendo 10% soro fetal bovino. Foram sete poços para cada diluição, das linhas A-H e G foi utilizado como controle negativo. Após oito dias, foi possível visualizar o efeito citopático, entretanto, as placas foram mantidas até o 15º dia para confirmação dos resultados observados. O valor do título em partículas virais/mL foi de acordo com o cálculo: $1000/350$ (volume total dos sete poços para cada diluição) x nºpoços com efeito citopático.

4.9 Caracterização dos vetores adenovirais

4.9.1 Seqüenciamento dos cDNAs p16 e p53

Os cDNAs p16 e p53 das construções plasmidiais pAdp16, pAdp53 e pAdp16IRESp53 foram seqüenciados no Laboratório de Cardiologia Molecular - InCor (Instituto do Coração – FM/USP). Na figura 6, estão representadas as seqüências e as posição dos oligonucleotídeos virais utilizados. As seqüências foram comparadas com as depositadas na base de dados *Genbank*, do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI) e identificadas através do BLASTn.

Figura 6: Representação esquemática da posição dos oligonucleotídeos na construção plasmidial pAdp16IRESp53.

4.9.2 Ensaio de PCR para verificação da presença de vírus competentes de replicação (*RCA-Replication Competent Vírus*)

A extração do DNA viral que antecedeu a reação de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) foi de acordo com o protocolo a seguir: 10 µl dos vírus Adp53 e Adp16IRESp53 purificados em gradiente de cloreto de cério, foram incubados na presença de 2 mg/mL de proteinase K, 0,5% SDS à 37° C *overnight*. Posteriormente a extração protéica com fenol-clorofórmio, o DNA foi precipitado com etanol 100% e NaCl 5M e lavado com etanol 80%. Os oligonucleotídeos E1A *forward*: 5' GGAGGTGTTATTACCGAAGA 3', E1A *reverse*: 5' CGGTACAGGTTTGGCATAG 3', E1B *forward*: 5'TGTGAGACACAAGAATCGCC 3', E1B *reverse*: TACCCTAATAGCCTCCTCAA 3' foram utilizados na reação de amplificação de acordo com o programa 95°C-2', 95°C-30'', 58°C-30'', 72°C-30'' - 35 ciclos - 72°C-5'. Como controle da reação, foi amplificado o gene p53 em Adp53 e Adp16IRESp53 com os oligonucleotídeos citados no item 4.9.3 de Material e Métodos. DNA do adenovírus selvagem tipo 5 contendo os genes E1A e E1B foi utilizado como controle positivo (gentilmente cedido pela Prof^a Dra Charlotte Mariana Harsi – Depto de Microbiologia, ICB-USP). Os DNAs amplificados foram visualizados em gel de agarose 1.2% corado com Brometo de Etídeo.

4.9.3 Identificação dos transcritos p16 e p53 em células H358 transduzidas com Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53

A presença dos mRNAs dos transgenes p16 e p53 transcritos pelos vetores virais Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53 foi analisada por ensaio de RT-PCR (*Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction*). Após 48 horas de transdução com os vírus da 1ª amplificação, o RNA total das células H358 foi extraído com Trizol (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. Em seguida, os cDNAs foram sintetizados utilizando *random primers* de acordo com Sambrook *et al.*, 1989 e amplificados com os oligonucleotídeos: p53 *forward*: 5'-GTGAGGCGCTGCCCCACCAT-3', p53 *reverse*: 5'-GGGAGAGGAGCTGGTGTGTT-3', p16 *forward*: 5'-CTACAGGGCCACAACCTGCC-3', p16 *reverse*: 5'-GGACCTTCCGCGGCATCTAT-3', GAPDH *forward*: 5'-

CTGCACCACCAACTGCTTA-3', GAPDH *reverse*: 5'-CATGACGGCAGGTCAGGTC-3'. Os programas de PCR utilizados foram: p16: 94°C-2', 94°C-30'', 58°C-30'', 72°C-30'' - 35 ciclos - 72°C-5', p53-GAPDH: 95°C-4', 95°C-1', 58°C-1', 72°C-1' - 35 ciclos - 72°C-5'. Os cDNAs amplificados foram visualizados em gel de agarose 1.2% corado com Brometo de Etídeo.

4.9.4 *Western Blot* para detecção das proteínas p16 e p53 na linhagem H358 transduzida com os vetores virais Adp16, Adp53, Adp16IRESp53 e o *reporter* AdeGFP.

As células foram transduzidas com os vírus da 1ª amplificação - AdeGFP, Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53, com M.O.I. igual a 100. Após 48 horas de transdução, as células foram lisadas em tampão Tris-HCl pH 7,5 50mM, NaCl 150mM, 0.5%NP-40 e aprotinina 2000 U/mL, PMSF 0.1mM e ortovanadato de sódio 10mM. Os lisados foram centrifugados por 10 minutos a 12000 rpm e os sobrenadantes incubados com 1:250 do anticorpo policlonal α -p16 humano H-156 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA), e 1:200 do anticorpo monoclonal α -p53 humano PAB 421 durante 12 horas à 4°C, sob agitação. Os imunocomplexos foram submetidos à precipitação com proteína-A por 1 hora a 4°C sob agitação. Após duas lavagens em tampão de lise, foram adicionados 20- μ L do tampão de amostra: SDS 2%, Tris-HCl pH 6.8 60mM, azul de bromofenol 0,001%, DTT 0.2M e 2-mercaptoetanol. Em seguida, as amostras foram fervidas por 4 minutos e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, 16% e 10% para análise das proteínas p16 e p53, respectivamente. O marcador de peso molecular biotinilado - ECL (ECL- Amersham Pharmacia Biotech, England) foi utilizado como padrão. Como controles positivo e negativo para a proteína p16 e p53 foram utilizados lisados de células 293 A e células H358 transduzidas com AdeGFP, respectivamente. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose durante 1,5 hora, a 25 Volts, em tampão de transferência (glicina 192mM, Tris base 25mM, metanol 20%). Para o bloqueio, a membrana foi incubada *overnight*, à 4°C, com 5% de leite em pó desnatado (Molico), em tampão T-TBS pH 7,6 (Tris base 20mM, NaCl 140mM, Tween 20 0,1%). A solução de bloqueio foi removida após três

lavagens em T-TBS. As proteínas transferidas para a membrana foram incubadas com os anticorpos α -p16 humano H156 (1:2000 em T-TBS) e α -p53 PAB 421 (1:5000 em T-TBS), durante 4 horas, à 4° C, sob agitação. Após três ciclos de lavagens em T-TBS, as membranas foram tratadas com o anticorpo secundário e reveladas com peroxidase conjugada com estreptavidina (Amersham, Arlington Heights, IL-USA) de acordo com as instruções do protocolo do *kit ECL plus* (ECL-Amersham Pharmacia Biotech, England).

4.9.5 Imunocitoquímica para as proteínas p16, p53, p21 e pRb na linhagem H358 transduzida com os vetores virais Adp16, Adp53, Adp16IRESp53, Adp16+Adp53 e o *reporter* AdLacZ

Cem mil células foram plaqueadas sobre lamínulas em bandeja de 12 poços. No dia seguinte, as células foram transduzidas com os vírus AdLacZ, Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53 com MOI de 50. Após 48 horas, as células foram lavadas com PBS, 3 vezes por 5 minutos cada e fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas com PBS três vezes por 10 minutos e permeabilizadas com NP40 0,1% em PBS por 30 minutos a 37°C. Novamente, as células foram lavadas em PBS, 3 vezes por 10 minutos e bloqueadas com albumina 1% por 30 minutos a 37°C. Posteriormente, as células foram lavadas em PBS duas vezes por 5 minutos e incubadas em câmara úmida a 4°C *overnight* com anticorpo primário. Os anticorpos utilizados foram DO-1 α -p53 humano monoclonal (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA), α -p16 humano policlonal (Pharmingen), H-121 α -p21 humano policlonal (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA) e α -pRb humano policlonal (Phospho-Rb-Cell Signaling). Todos os anticorpos primários foram diluídos na proporção de 1:100 em PBS contendo albumina 1%. Em seguida, as células foram lavadas em PBS quatro vezes por 10 minutos e incubadas com anticorpo secundário diluído em PBS por 90 minutos a 4°C em ambiente escuro. A diluição dos anticorpos secundários anti-*mouse* ALEXA 488, anti-*rabbit* Alexa 594 e anti-*rabbit* Alexa 350 (Invitrogen) foi de 1:500 em PBS. Em seguida, as células foram lavadas em PBS por 5 minutos e incubadas por 30 minutos em

solução contendo o marcador nuclear Hoechst 33342 (Invitrogen) na concentração de 100 µg/mL. Após a incubação, as células foram lavadas três vezes por 10 minutos em PBS. Na sequência, as lamínulas foram montadas em meio de montagem Vectashield (Vector Laboratories, Inc) e visualizadas em microscopia confocal (LSM 510 Meta Zeiss/UV –InCor (Instituto do Coração – FM/USP).

4.9.6 Verificação da integridade funcional do gene p53 selvagem e conseqüente funcionalidade do elemento IRES na configuração bicistrônica Adp16IRESp53 e monocistrônica Adp53

Essa análise foi realizada com base no sistema retroviral pCLPG (Strauss e Costanzi-Strauss, 2004). A integridade funcional de p53 selvagem codificada pelos vírus Adp53 e Adp16IRESp53 foi confirmada utilizando a linhagem *reporter* H358^{pCLPG_{eGFP}}. Esta linhagem carrega o gene eGFP sob controle do elemento PG que responde a presença de p53 selvagem. Neste sistema as células com p53 selvagem aumentam a expressão de eGFP. Resumidamente, 1×10^5 células H358^{pCLPG_{eGFP}} foram plaqueadas em bandeja de 6 poços. No dia seguinte, as células foram transduzidas com os vetores adenovirais Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53, MOI de 50. A intensidade de fluorescência e a porcentagem de células eGFP positivas foram determinadas após 48 horas por citometria de fluxo. Foram adquiridos 10000 eventos no filtro FL1, (530/630nm) e analisados através do *software Cell Quest - FACScalibur (Becton Dickinson)* – Depto de Fisiologia e Biofísica, ICB-USP.

4.10 Ensaios funcionais *in vitro* nas linhagens H358 e A549 transduzidas com os vetores virais Adp16, Adp53, Adp16IRESp53 e o *reporteres* AdeGFP ou AdLacZ

As linhagens H358 e A549 foram transduzidas com os vírus purificados AdeGFP ou AdLacZ (de acordo com o experimento), Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53, MOI de 50. Como controle dos *reporteres*, foi utilizado as linhagens sem transdução viral (*mock*). A MOI foi definida após realização da curva de eficiência de transdução em que partículas virais crescentes foram transduzidas para detecção do eGFP em citometria de fluxo. Para todos os ensaios, volumes reduzidos de meio foram utilizados por três horas, inclinando a placa de 15 em 15 minutos antes de completar com meio para o volume de cada placa utilizada.

4.10.1 Curva de crescimento na linhagem H358

Vinte mil células H358 foram plaqueadas/poço em triplicata em bandeja de 24 poços para análise nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas. No dia seguinte, as células foram transduzidas com os vírus AdeGFP, Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53 em 100µl de meio + vírus. Nos tempos indicados, as células foram lavadas com PBS, fixadas com formaldeído 10% por 10 minutos a 4°C e lavadas com água destilada. Em seguida, foram coradas com solução 0,1% de Cristal Violeta por 30 minutos a temperatura ambiente. As placas foram lavadas em água corrente e após secagem, o cristal violeta foi extraído dos poços com 2 mL de Ácido Acético 10%, diluído 1:4 em água milliQ e a absorbância foi medida em 590 nm através de espectrofotômetro.

4.10.2 Ciclo celular

Em bandeja de 6 poços, foram plaqueadas de 1 - 2×10^5 células H358/poço em duplicata para análise nos tempos de 24, 48, 72 horas e 5×10^4 células A549/poço em duplicata no tempo de 72 horas. No dia posterior, as células foram transduzidas com AdeGFP ou AdLacZ, Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53 em 600µl de meio + vírus. Nos tempos indicados, as células foram tripsinizadas, lavadas em PBS e fixadas com Etanol 70% por 30 minutos. Em seguida, as preparações foram

centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos, lavadas em PBS e incubadas com 20 µg/mL de Iodeto de Propídeo, 20 µg/mL de RNase e 0,1% de Triton-X por 30 minutos a 37°C. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas, lavadas e mantidas em PBS a 4°C para posterior análise em citometria de fluxo. Foram adquiridos 10000 eventos em filtro FL2 (585/642nm) e analisados através do *software Cell Quest - FACScalibur (Becton Dickison)* – Depto de Fisiologia e Biofísica, ICB-USP. Em todas as análises foram descontados *debris* celulares.

4.10.3 Ensaio de co-transdução na linhagem H358 com Adp16 e Adp53

Análises de ciclo celular foram realizadas nas células H358 após diversos regimes de co-transdução, como indicado na tabela abaixo. A carga viral foi MOI de 50 para os itens 1 – 10, com exceção do item 2, onde utilizamos carga viral igual a 100. Após 96 horas de transdução, as análises do ciclo celular foram feitas como descrito anteriormente no item 4.10.2 de Material e Métodos.

Tabela 1: Relação dos diferentes regimes de co-transdução realizados na linhagem H358

Condições de co-transdução
1- Mock
2- AdLacZ
3- Adp16
4- Adp16 - após 48hs – AdLacZ
5- Adp16 - após 48hs - Adp53
6- Adp53
7- Adp53 - após 48hs – AdLacZ
8- Adp53 - após 48hs - Adp16
9- Adp16+Adp53 (co-transdução)
10- Adp16IRESp53

4.10.4 Ensaio de luciferase na linhagem H358

Nesse ensaio, analisamos a modulação dos níveis de E2F após transdução adenoviral da linhagem *reporter* H358^{FE2FLW}. O vetor lentiviral FE2FLW (gentilmente cedido por Dr. Bryan Strauss – InCor), possui o gene do promotor de E2F *upstream* ao gene *reporter* luciferase (Strauss *et al.*, 2006). Portanto, a atividade de luciferase é proporcional à quantidade de E2F celular. O experimento iniciou-se com a transdução nas células H358 com o vetor lentiviral FE2FLW. Quarenta e oito horas depois, as células foram tripsinizadas e plaqueadas na densidade de $1,5 \times 10^5$ células/poço em bandeja de 12 poços em triplicata. No dia seguinte, as células foram transduzidas com os vetores AdLacZ, Adp16, Adp53, Adp16IRESp53 e a cinética de inibição de E2F foi acompanhada em uma curva de 1 a 48 horas após transdução adenoviral. O protocolo do ensaio de luciferase foi de acordo com Strauss *et al.*, 2006. Resumidamente, as células foram lisadas com 100mM K₂HPO₄, pH7,8, 1mM EDTA. Na presença de 10 µL do substrato luciferina (Luciferase Assay System- Promega), a atividade de luciferase foi medida no luminômetro Analytical Luminescence laboratory - Monolight® 2010, (Laboratório de Cardiologia Molecular - InCor (Instituto do Coração – FM-USP). A concentração de proteína total foi determinada através do método Bradford, e serviu para normalização da quantidade protéica de cada amostra.

4.10.5 Determinação do tamanho e granulosidade celular na linhagem H358

O tamanho e a granulosidade das células H358 foram analisados no *software* CellQuest - gráficos FSC (*Forward Scatter Cell*) versus SSC (*Side Scatter Cell*) – FACScalibur (*Becton Dickison*). A luz difratada fornece informações morfológicas, relacionadas ao volume celular (FSC), enquanto a dispersão da luz a 90° é resultado do que é refratado e refletido (SSC) – granulosidade. As células avaliadas foram as mesmas analisadas nos ensaio de ciclo celular.

4.10.6 Ensaio de senescência associada a β -galactosidase na linhagem H358

Esse protocolo foi de acordo com Dimri *et al*, 1995, com modificações. Após 12 horas de transdução com os vetores AdLacZ, Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53, 1×10^4 das células H358 foram re-plaqueadas em placas de 35mm. Decorridos seis dias, as células foram lavadas duas vezes com PBS, pH 7,2, fixadas com glutaraldeído 0,5% por 5 minutos a temperatura ambiente e lavadas duas vezes com PBS pH 6,0. Em seguida, foram incubadas com 1mg/mL de X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-Indolyl-B-D-Galactoside), 0,12mM $K_3Fe(CN)_6$, 0,12mM $K_4Fe(CN)_6$, 1mM $MgCl_2$ em PBS pH6.0 *overnight* a 37°C. Posteriormente, foram mantidas em PBS à 4° C. As imagens de células senescentes foram capturadas em microscópio de contraste de fase NIKON TKS.

4.10.7 Ensaio de caspase-3 na linhagem H358

Foram plaqueadas $1,5 \times 10^5$ células/poço em bandeja de 12 poços em triplicata. Após 1 a 48 horas de transdução com os vetores adenovirais AdLacZ, Adp16, Adp53, Adp16IRESp53, o ensaio foi conduzido de acordo com instruções do fabricante – *EnzChek®Caspase-3 Assay Kit 2*. Resumidamente, nessa reação, resíduos de aspartato estão conjugados com rodamina110 (Z-DEVD-R110). Após a clivagem enzimática pela caspase-3, a fluorescência é emitida. As amostras foram incubadas *overnight* com Z-DEVD-R110 e as leituras realizadas no fluorímetro Wallac Victor² - 1420 Multilabel counter (*Perkin Elmer*) – (Laboratório de Cardiologia Molecular – InCor, Instituto do Coração – FM/USP). A concentração de proteína total foi determinada através do método Bradford, que serviu para normalização da quantidade protéica de cada amostra.

4.10.8 Ensaio de PCR em tempo real para quantificação dos transcritos de p16, p53, p21, MDM2, Bax, SVV e FoxO em células H358 transduzidas com Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53

Esta análise fez parte do objetivo de avaliar as vias de ativação molecular envolvidas nas células H358 após remediação com os genes p16 e p53. Está sendo desenvolvida pela aluna de Iniciação Científica do nosso laboratório Mari Oliveira Mota Kussuki.

Os mRNAs foram quantificados após 36 horas de transdução com os vetores virais AdLacZ, Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53. Além de p16 e p53, foram avaliados os transcritos de alguns genes endógenos da via de p53, incluindo MDM2 e p21, via de morte celular, Bax e de sobrevivência através de FoxO e SVV. O RNA total das células H358 tratados com os adenovírus foi extraído conforme instruções do fabricante – *Kit RNAeasy®FFPE* - Qiagen. Os cDNAs foram sintetizados utilizando *random primers* como iniciadores de acordo com Sambook *et al.*, 1989. *Primers* específicos foram desenhados com auxílio do programa Primer 3 - versão 0.4.0 (Rozen e Skaletsky, 2000) e tiveram sua identidade confirmada por meio do programa BLAST do *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). A tabela 2 apresenta as seqüências de nucleotídeos correspondentes aos *primers* utilizados. Nas reações, foram utilizados valores entre 50ng a 1000ng de *primers* para padronizar e avaliar a eficiência de cada par de *primers*.

As reações foram feitas com o SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). *Sybr Green* é o agente que aumenta a fluorescência quando uma dupla-fita é gerada na reação de amplificação, o primeiro aumento significativo na quantidade de amplificado é chamado de C_T (*threshold cycle*) e indica a quantidade inicial de amostra (Bustin, 2000). Curvas de dissociação foram traçadas para acompanhar a amplificação exclusiva do produto de interesse. O termociclador foi programado para 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos repetidos de 95°C por 15 seg e 60°C por 1 minuto. Todos os ensaios foram feitos em triplicatas e acompanhados de controle negativo específico para cada *primer*. A expressão relativa do transcrito para proteína ribossomal RPL19 foi utilizada como normalizador e controle interno (*house keeping gene*). O valor de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ que indica a quantidade relativa da expressão transcricional dos genes de interesse foi calculada com a seguinte fórmula: $2^{-[\Delta C_t \text{ (de interesse)} - \Delta C_t \text{ (de RPL19)}]}$ (Dussault e Pouliot, 2006). Para possibilitar a comparação entre as quantidades relativas dos transcritos de interesse em diversas condições experimentais, utilizamos os valores obtidos nas células transduzidas com AdLacZ na normalização, que recebeu o valor igual a 1.

Tabela 2: Sequência dos *primers* utilizados no ensaio de PCR em tempo real

Gene	<i>Primer – Forward 5' - 3'</i>	<i>Primer – Reverse 5' - 3'</i>
Bax	CCCTTTTGCTTCAGGGTTTC	TCTTCTTCCAGATGGTGAGTG
FoxO	AGTCTGAGGTGCTGGCGGAG	GGTGGTGGCGTATCAGAGG
MDM2	GCGTGCCAAGCTTCTCTGT	CTGAGTCCGATGATTCCTGCT
p16	CTACAGGGCCACAACCTGCC	GGACCTTCCGCGGCATCTAT
p21	TGCCCAAGCTCTACCTTCC	CCACATGGTCTTCCTCTGCT
p53	CTTTGAGGTGCGTGTTTGTG	AGAGGAGCTGGTGTTGTTGG
RPL19	TCTCATGGAACACATCCACCA	TGGTCAGCCAGGAGCTTCTT
SVV	TCTGGGAAGGGTTGTGAATG	AGTTTGGCTTGCTGGTCTCT

4.10.9 Morte celular na linhagem A549

As células da linhagem A549 foram plaqueadas (5×10^4 células/poço) em bandejas de 6 poços em triplicata. No dia seguinte, as células foram transduzidas com AdLacZ, Adp16, Ad53 e Adp16IRESp53. Setenta e duas horas após transdução, o ensaio foi conduzido de acordo com informações do fabricante (*Kit #4 Apoptosis Assay* – Invitrogen). As amostras foram analisadas em citometria de fluxo. Foram adquiridos 10000 eventos em filtro FL1 (530/30nm) e FL3 (670nm) e analisados através do *software Cell Quest - FACScalibur (Becton Dickison)* – Depto de Fisiologia e Biofísica, ICB-USP. Em todas as análises foram descontados *debris* celulares.

4.11 Tratamentos dos tumores derivados de células H358 produzidos em camundongos *nude*

Neste protocolo, utilizamos camundongos atímicos BALB C/*nude*, machos e fêmeas com aproximadamente dois meses de idade. Os procedimentos estão de acordo com a Comissão de Ética em experimentação animal do ICB-USP. Esses animais foram cuidadosamente mantidos em microisoladores, com ração, maravalha

e água autoclavados em estante ventilada, climatizada e equipada com filtro HEPA. O regime de alimentação foi *Ad libitum*.

4.11.1- Administração dos vetores virais Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53 e o controle AdLacZ *in situ* nos tumores H358

Dois bilhões de células H358 foram injetadas no subcutâneo, região dorsal de camundongos BALB C/*nude*. O volume médio dos tumores no início do tratamento foi de $52,42 \pm 17,65 \text{ mm}^3$ (aproximadamente 2 semanas após injeção das células). Para a administração viral, os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (Vetbrands) juntamente com o relaxante muscular cloridrato de xilazina (Bayer) nas concentrações de 0,012% e 0,2% respectivamente em solução salina ou PBS. O volume final utilizado foi de aproximadamente 80 μL para cada animal com peso médio entre 15-20g. Os vírus foram injetados em no mínimo dois quadrantes com doses que variaram entre 10^{10} e 10^{11} vírus por tumor administrado em volume de 50 μL , utilizando seringa Hamilton (Hamilton Company) com agulha de insulina. O número de células por mm^3 foi extrapolado do trabalho de Al-Hendy 2004, o qual estabelece 3×10^8 células/ cm^3 de tumor. O volume tumoral foi determinado pela fórmula $\frac{1}{2} \times L \times W^2$, onde L é o comprimento e W a maior distância perpendicular a L, descrita por Tomayko *et al.*, 1989. Os valores do volume tumoral foram convertidos em volume relativo, considerando os volumes no dia do tratamento igual a 1. Esse passo foi utilizado para ajustar os volumes dos tumores entre os diferentes animais tratados.

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais distintos, descritos na tabela 3.

Tabela 3: Ensaios realizados em camundongos BALB C/*nude* após administração com os vírus AdLacZ, Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53.

Curva de crescimento	Análise anátomo-patológica
7 - 10 animais por grupo, acompanhados por 30 dias após administração viral.	72 horas após administração viral: -Ensaio de morte celular; -Análise histológica (Hematoxilina/Eosina)

Para as análises anátomo-patológicas, as amostras foram retiradas, dissecadas em PBS, fixadas em formaldeído 10% por 8 horas e mantidas em Etanol 70% para posterior inclusão em parafina.

A eficiência de transdução *in situ* foi observada com AdLacZ. Após 48 horas de transdução tumoral, as amostras foram dissecadas e lavadas duas vezes com PBS + 0,2% Tween por 5 minutos e PBS por 5 minutos. Na seqüência, as amostras foram fixadas em solução contendo 50% paraformaldeído (4%), 0,8% glutaraldeído, 0,02% NP40 em tampão fosfato de sódio 100mM pH 7,3 por duas horas à 4° C. Após lavagem em PBS por 5 minutos, os preparados foram deixados *overnight* em solução β -galactosidase com 0,06% $MgCl_2$ 2M, 2% de 50mM $K_3Fe(CN)_6$, 2% de 50mM $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ 0,02% de NP40 e 1% de X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl B-D-galactoside) 100mg/mL. Em seguida, as amostras foram lavadas em PBS + DMSO 3% 3 vezes por 10 minutos cada, mantidas em PBS à 4°C para posterior inclusão em parafina.

Os ensaios de morte celular foram realizados através do método TUNEL (*Terminal deoxy-ribonucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling*), segundo recomendações do fabricante (*In situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein-Roche, EUA*). Esse método tem como princípio a marcação de seqüências de DNA que sofreram fragmentação devido ao processo de apoptose.

A presença dos transcritos de p16 e p53 nos tumores de H358, foi realizada em preparados de tumor congelados em nitrogênio líquido (-196°) após 72 horas de administração viral. As amostras congeladas foram homogeneizadas no equipamento *Powergen* 125 (Fisher Scientific, USA) na presença de Trizol, seguido do protocolo de extração de RNA recomendado pelo fabricante (GIBCO BRL-Life Technologies, USA). A análise transcricional foi realizada por PCR em tempo-real, como descrito no item 4.10.8 de Material e Métodos. As imagens dos cortes de HE e dos submetidos à reação de TUNEL foram capturadas em microscópio Nikon Eclipse 80i (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, EUA), *software* de imagem: NIS-Elements Advanced Research 2.30, 2006. (Depto de Farmacologia – ICB-USP).

4.12 Análise estatística

4.12.1 Cálculos utilizados para análise dos resultados *in vivo*

Os dados *in vitro* (ensaios de curva de crescimento e ciclo celular) foram analisados por Rosana Prisco (serviço de análise de estatística, ICB-USP). Os resultados foram analisados estatisticamente empregando-se ANOVA, com um fator para análise de apenas um tempo de transdução viral e, dois fatores para ensaios de transdução viral ao longo do tempo. Todos os testes foram seguidos de comparações múltiplas pelo método de Tukey, a homogeneidade de variâncias foi verificada e o nível de significância adotado foi $p \leq 0,05$.

A análise dos dados *in vivo* foi realizada pela equipe do Centro de Estatística Aplicada (CEA), IME-USP, com auxílio do Dr. Marcus Vinícius C. Baldo (Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB-USP). A análise estatística para comparação entre os valores de TTE entre diferentes grupos tratados foi determinada pelo teste de *log rank* obedecendo 95% de confiança.

Os cálculos e análises do crescimento dos tumores foram realizados seguindo o mesmo protocolo da *JAX in vivo service xenograft study* (The Jackson Laboratory-USA). Brevemente, o cálculo de TGD (*Tumor Growth Delay*) foi usado para analisar o efeito do tratamento com os vírus supressores de tumor no instante final ou TTE (*Time Tumor End point*). Para o cálculo do TTE utilizamos o valor final de 800mm³ (volume do tumor tratado com AdLacZ no 28º dia após tratamento). O TTE foi definido em dias aplicando a fórmula: $TTE = [\log_{10}(800) - b] / m$. O valor de b foi o intercepto no eixo y e representou a inclinação (*slope*) da curva calculado a partir de regressão linear, transformando em logaritmo as medidas dos tumores em cada ponto. O valor de TGD foi expresso em porcentagem e estimado após aplicação da equação: $TGD = [(ct - c) / c] \times 100$, onde t representa a média TTE em dias para cada grupo tratado, c representa a média TTE em dias para o grupo controle tratado com AdLacZ.

Os efeitos de regressão parcial e estabilidade do tumor foram verificados através da análise de cada animal em seu grupo respectivo. A regressão parcial tumoral é definida como a quantidade de tumores com volumes abaixo de 50% (ou 0,5) do volume inicial, determinados por no mínimo três medidas consecutivas. Em nosso estudo, definimos que a estabilidade tumoral foram os tumores que apresentaram volumes relativos entre 0,5 e 1,2 em relação ao volume inicial,

determinados por seis medidas consecutivas.

5 RESULTADOS

5.1 Construção dos vetores adenovirais AdeGFP, Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53

A figura 7 mostra os mapas e fragmentos de restrição que caracterizam os plasmídeo de entrada pENTR2B Δ que serviram como doadores dos cDNAs de eGFP, p16, p53 e do cassete bicistrônico p16IRESp53 para o vetor adenoviral de destino pAdDestCMV. A figura 8 apresenta os mapas dos vetores adenovirais monocistrônicos pAdeGFP, pAdp16 e pAdp53 e do vetor adenoviral bicistrônico pAdp16IRESp53. A identidade de todos os vetores foi confirmada através de análises de restrição (Tabela 4) e seqüenciamentos (Anexo 1).

Tabela 4: Identidade de restrição dos plasmídeos de entrada e adenovirais.

Vetores	Enzimas de restrição	Fragmentos de restrição (pb)
pENTR2B Δ	BamHI	2200
pENTR2B Δ eGFP	BamHI	700 e 2200
pENTR2B Δ p16	EcoRI e XhoI	800 e 2200
pENTR2B Δ p53	SmaI	4200
pENTR2B Δ p16Ip53	EcoRI	800 e 4500
pAdDest	BamHI	19510; 14529,2131; 516
pAd eGFP	BamHI	18840; 14529; 1495; 800 e 516
pAd p16	BamHI	19640; 14529; 1495 e 516
pAd p53	BamHI	18640; 14529; 1495; 2200 e 516
pAd p16IRESp53	BamHI	21940; 14529; 1495 e 516

5.2 Titulação e análise da presença de *Replication Competent Adenovirus* (RCA) nas preparações dos adenovírus AdeGFP, Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53

Todas as produções de adenovírus foram tituladas com dois métodos diferentes: método físico e biológico. Por ser rápido e fácil o método físico é o mais popular, mas como indica o número total de partículas virais, incluindo viáveis e não viáveis, não é adequado para harmonização de títulos entre preparações virais. A titulação pelo método biológico quantifica apenas o número de partículas virais viáveis, sendo mais adequada para ensaios que utilizam diferentes preparações. Nós escolhemos utilizar os valores de títulos virais obtidos pelo método biológico, pois possibilita uma melhor harmonização entre os diversos ensaios de transdução com diferentes preparações virais. A tabela 5 compara os valores médios entre os títulos físico e biológico obtidos para as produções dos adenovírus AdeGFP, Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53. O valor médio entre as relações de título físico e biológico foi de uma partícula viral viável para cada 20,6 partículas virais totais produzidas e esta relação está dentro do esperado e coincide com os valores indicados na literatura para os protocolos de produção de adenovírus.

Tabela 5: Valores e relações de títulos físico e biológico das produções adenovirais, expressos em VP/mL (*viral particles per ml*) e CPEU/mL (*cytopathic effect unit per ml*).

Vírus	Título físico OD – VP/mL	Título biológico CPEU/mL	Relação entre título físico e título biológico
AdeGFP	5.3×10^{11}	1.7×10^{10}	1:31
AdLacZ	3.0×10^{12}	2.0×10^{11}	1:15
Adp16	4.7×10^{12}	1.4×10^{12}	1:33
Adp53	1.8×10^{12}	2×10^{11}	1: 9
Adp16IRESp53	1.8×10^{12}	1.7×10^{11}	1:15

Ausência de RCA nas preparações de adenovírus é um importante fator de segurança e qualidade das preparações de adenovirus recombinantes. A figura 9 ilustra os resultados do ensaio de PCR utilizado para confirmar a ausência de RCA nas preparações dos vírus Adp53 e Adp16IRESp53. Fragmentos dos cDNAs correspondentes aos genes E1A e E1B foram amplificados apenas nas amostras de DNA extraído de adenovírus 5 selvagem.

Figura 7: Caracterização das construções dos plasmídeos de entrada pENTR2BAΔeGFP pENTR2BAΔp16, pENTR2BAΔp53 e pENTR2BAp16IRESp53. A: Mapas simplificados do conjunto dos plasmídeos de entrada, B: Eletroforese em gel de agarose revelando os fragmentos de restrição que caracterizam os plasmídeos de entrada. Amostras: 1- pENTR2BAΔ tratado com EcoRI, 2- pENTR2BAΔeGFP tratado com BamHI, 3- pENTR2BAp16 tratado com EcoRI + XhoI, 4, pENTR2BAp53 tratado com SmaI, 5 - pENTR2BAp16IRESp53 tratado com EcoRI.

Figura 8: Caracterização das construções dos vetores adenovirais pAdeGFP pAdp16, pAdp53 e pAdp16IRESp53. A: Mapas simplificados do conjunto de vetores adenovirais, B: Eletroforese em gel de agarose revelando os fragmentos de restrição que caracterizam os vetores adenovirais digeridos com BamHI. Amostras: 1- pAddest, 2- pAdeGFP, 3- pAdp16, 4- pAdp53, 5-pAdp16IRESp53.

Figura 9: Avaliação da presença de vírus competentes de replicação (RCA) nas produções de Adp53 e Adp16IRESp53. A. Alinhamento dos *primers* utilizados nas amplificações dos fragmentos de E1A (449pb), E1B (329pb) e p53 (431bp), B: Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR. Amostras 1 e 2: DNA de Ad5 selvagem; amostras 3 e 5: DNA de Adp53 e Adp16IRESp53, respectivamente amplificados com *primers* de E1A e E1B e amostras 4 e 6: DNA de Adp53 e Adp16IRESp53, respectivamente amplificados com *primers* de p53, PM: marcador de peso molecular de 100pb.

5.3 Determinação de eficiência de transdução adenoviral das células H358 derivadas de carcinoma de pulmão

A figura 10 apresenta os resultados de ensaios realizados para determinar o melhor regime de transdução para as células da linhagem H358. A figura 10A mostra as porcentagens de células eGFP positivas determinadas por citometria de fluxo, onde um número fixo de células H358 foi transduzido com diferentes multiplicidades de infecção (MOIs) e analisados 24, 48 e 72 horas após a transdução. Obtivemos valores superiores a 80% de células transduzidas quando dose de 30 ou mais partículas virais/célula foram aplicadas na transdução. A figura 10B mostra imagens de microscopia confocal e medidas de citometria de fluxo obtidas 48 horas após transdução de células H358 com MOI de 50. Com este regime de transdução atingimos uma eficiência de transferência gênica de aproximadamente 90% das células H358 e esta dose foi escolhida para realização de todos os ensaios de transdução viral.

5.4 Expressão dos transgenes p16 e p53 mediada pelos vírus Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53 na linhagem de carcinoma de pulmão H358

Expressão dos transgenes de p16 e p53 mediada pelos vetores adenovirais monocitrônicos e bicitrônico foi verificada em nível de RNAm e proteína (Figura 11).

Os transcritos de p16 e p53 foram analisados utilizando RT-PCR convencional e PCR em tempo real. A figura 11A identifica os produtos da PCR correspondentes aos transcritos dos transgenes p16 e p53. Observamos que as células H358 transduzidas com o vetor Adp16IRESp53 expressam ambos os cDNAs. A figura 11C apresenta medidas quantitativas dos transcritos de p16 e p53 obtidas com o ensaio de PCR em tempo real, o qual permitiu comparar a expressão dos transcritos adenovirais monocitrônicos com o transcrito adenoviral bicitrônico. A expressão relativa de cada transcrito foi normalizada em relação a sua expressão na versão monocitrônica, ou seja, atribuindo-se o valor igual a 1 para o nível de expressão de p16 e p53 produzida pelos vírus Adp16 e Adp53, respectivamente. Comparação entre a quantidade relativa do transcrito de p16 ou p53 produzida pelo adenovírus monocitrônico com a do bicitrônico verificamos que ambos os genes são expressos em maior quantidade pelo vírus Adp16IRESp53. A quantidade dos transcritos de p16 e p53 foi 2,5 e 3,0 vezes maior nas células H358 transduzidas com o vírus Adp16IRESp53 do que nas células transduzidas com os vírus Adp16 ou Adp53, respectivamente.

A expressão das proteínas transgênicas p16 e p53 também foi confirmada por *Western Blot*. A figura 11B mostra que o cassete de expressão bicitrônico é capaz de promover a expressão de ambas as proteínas p16 e p53 nas células H358. Os adenovírus monocitrônicos Adp16 e Adp53 também induziram a expressão das proteínas p16 e p53, respectivamente.

Com o objetivo de visualizar e co-localizar a expressão de p16 e p53 ao nível celular realizamos ensaios de imunocitoquímica nas células H358 transduzidas com os vírus Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53. As imagens de microscopia confocal (Figuras 12 e 13) mostraram células H358^{Adp16IRESp53} expressando simultaneamente p16 e p53. A expressão das proteínas p16 e p53 também foi visualizada nas células transduzidas com os adenovírus monocitrônicos Adp16 e Adp53. A localização de

p53 foi claramente nuclear, mas a proteína p16 foi visualizada também no citoplasma. Visando a caracterização do compartimento celular da proteína p16, realizamos cortes seriados sob microscopia confocal, que revelaram a presença da proteína p16 também no núcleo celular. (Figura 12B).

Figura 10: Avaliação da eficiência de transdução das células H358. A: Histograma comparando porcentagens de células eGFP positivas produzidas com diferentes doses de AdeGFP e analisadas em diferentes tempos após transdução. Resultados obtidos através de citometria de fluxo, excitação 488nm, B: Determinação qualitativa e quantitativa de células H358^{AdeGFP} após 48 hs de transdução com MOI igual a 50 AdeGFP/célula. Imagens de microscopia confocal de células H358^{eGFP} capturadas em (a) campo claro e (b) campo escuro, excitação de 488nm; aumento de 100X. Análise de citometria de fluxo (FACS) de células H358 não transduzidas (c) e transduzidas com AdeGFP (d). Excitação a 488nm.

Figura 11: Expressão dos cDNAs de p16 e p53 mediada pelos adenovírus monocistrônicos Adp16 e Adp53 e pelo adenovírus bicistrônico Adp16IRESp53 nas células H358. A: Gel-eletroforese dos produtos de RT-PCR produzidos a partir do mRNA total extraído de células H358 transduzidas com os adenovírus Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53, utilizando *primers* específicos para p16, p53 e GAPDH (controle interno), B: Imunoprecipitação seguida de *Western blot* de lisados de células H358 transduzidas com os adenovírus Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53. As proteínas p16 e p53 foram identificadas utilizando anticorpos específicos como descrito em material e métodos. Lisado de células 293 serviu como controle positivo; C: Quantificação dos transcritos de p16 e p53 utilizando PCR em tempo real. Expressão do mRNAs dos transgenes foi normalizada em relação a expressão de p16 e p53 mediada pelos adenovírus monocistrônicos Adp16 e Adp53, respectivamente.

Figura 12: Imunocitoquímica das células H358 transduzidas com os vetores virais AdLacZ e Adp16. A: Imagens de microscopia confocal. 1: Núcleo corado com Hoechst 33342, (excitação a 364nm), 2: α -p53: (excitação a 488nm), 3: α -p16 (excitação a 594nm), 4: sobreposição das imagens 1 e 3, B: Corte seriado das células H358^{Adp16} identificadas com α -p16, (excitação a 594nm), demonstrando a localização da proteína p16 no citoplasma e núcleo. *Mock*: células não transduzidas

Figura 13: Imunocitoquímica das células H358 transduzidas com os vetores virais Adp53 e Adp16IRESp53. Imagens obtidas de microscopia confocal. 1: Núcleo corado com Hoechst 33342, (excitação a 364nm), 2: α-p53: (excitação a 488nm), 3: α-p16, (excitação a 594nm), 4: sobreposição das imagens 1 e 2 para Adp53; 1, 2 e 3 para Adp16IRESp53.

5.5 Avaliação da atividade funcional da proteína p53 como fator de transcrição quando expressa pelos vírus Adp53 e Adp16IRESp53

Células sensoras H358^{pCLPGeGFP} foram utilizadas para indicar a integridade da função transcricional da proteína p53 codificada pelos vetores Adp53 e Adp16IRESp53. Na linhagem sensora H358^{pCLPGeGFP} a expressão do gene marcador eGFP está sob comando do elemento *enhancer* PG que responde apenas ao fator de transcrição p53 com fenótipo selvagem. A linhagem H358^{pCLPGeGFP} foi especialmente criada em nosso laboratório com o objetivo de servir como ferramenta biológica para ensaios de monitoramento da atividade transcricional de p53 e confirmação da presença de p53 selvagem (Strauss e Costanzi-Strauss, 2004). Após transdução das células sensoras com os vírus Adp53 e Adp16IRESp53 observamos que a expressão do marcador eGFP aumentou nas células transduzidas com os vírus portadores de p53, o mesmo não acontecendo com as células H358 transduzidas com AdLacZ (Figura 14A). Estes dados confirmam a integridade funcional de p53 como fator de transcrição, quando codificado por ambas as configurações: mono e bicistrônica.

Como um fator de transcrição, p53 ativa a expressão de diversos genes e entre os mais conhecidos efetores de p53 está p21, um importante inibidor das CDKs de pRb. Apenas a versão selvagem da proteína p53 pode ativar a expressão de p21. A figura 14B mostra dados quantitativos da expressão do transcrito de p21 determinados através de PCR em tempo real em células transduzidas com Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53. Os resultados revelam aumento na expressão do transcrito de p21 apenas nas células H358 transduzidas com os adenovírus portadores de p53. Comparação entre a quantidade do transcrito de p21 induzida pelos vírus Adp53 com a do vírus Adp16IRESp53 mostra que a configuração bicistrônica induziu mais a expressão de p21. A figura 14C mostra a expressão da proteína p21 nas células transduzidas com os adenovírus Adp53 e Adp16IRESp53, mas fraca ou ausente expressão da proteína p21 nas células H358 transduzidas com o adenovírus controle AdLacZ, resultado compatível com a falta de p53 nas células H358.

Este conjunto de resultados demonstra que os vírus Adp53 e Adp16IRESp53 estão dirigindo a expressão da proteína p53 selvagem e também confirmam que o

mecanismo de tradução cap-independente, mediado pela seqüência intercistrônica IRES no vetor adenoviral Adp16IRESp53 está funcionando.

5.6 Inibição de E2F nas células H358^{Adp16}, H358^{Adp53} e H358^{Adp16IRESp53} como indicador indireto da ativação de pRb

Na tentativa de monitorar, mesmo que de forma indireta, a inibição do fator de transcrição E2F e conseqüentemente a ativação (hipofosfoilação) de pRb transduzimos células H358 com o lentivírus pFE2FLW. A região promotora do gene E2F-1 humano está inserida no vetor pFE2FLW e é responsável pela expressão do cDNA de luciferase. Nas células H358^{pFE2FLW} a atividade de luciferase é proporcional a ativação do fator E2F, funcionando como um sensor da proliferação celular e indicativo da fosforilação de pRb (Strauss *et al.*, 2006). A figura 15A apresenta medidas da atividade de luciferase nas células H358^{pFE2FLW} entre 1 a 48 horas após transdução com os vírus Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53. Observamos que todas as células tratadas com os adenovírus supressores de tumor sofreram redução na atividade de luciferase, em relação com a atividade de luciferase das células H358^{pFE2FLW} transduzidas com AdLacZ. Mas, enquanto que as células tratadas com o vírus bicistrônico Adp16IRESp53 começaram a exibir queda da atividade de luciferase 16 horas após transdução, as células tratadas com os vírus monocistrônicos Adp16 e p53 esta queda começou ao redor de 28 horas após transdução.

O vírus bi-supressor Adp16IRESp53 foi mais rápido e eficiente para reduzir a atividade de luciferase do que os vírus mono-supressores Adp16 ou Adp53. Essa queda reflete a diminuição na quantidade de E2F livre, provavelmente resultado da presença da proteína pRb na forma hipofosforilada, que passa a seqüestrar os fatores E2Fs.

Para investigar a participação de pRb no mecanismo de inibição da proliferação imposta pelo conjunto de adenovírus inibidores do ciclo celular, procuramos visualizar a proteína pRb na forma fosforilada nas células H358 transduzidas com os adenovírus Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53. A figura 15B ilustra imagens de ensaio de imunocitoquímica onde utilizamos um anticorpo que reconhece apenas a forma fosforilada de pRb. Detectamos claramente a presença da forma fosforilada de pRb nas células H358 transduzidas com adenovírus controle

AdLacZ. Em uma direção oposta, a forma fosforilada de pRb não foi visualizada nas células H358 transduzidas com o adenovírus Adp16IRESp53 sugerindo que pRb está na sua forma ativa, ou seja, hipofosforilada, capaz de inibir a atividade do fator E2F. Nas imagens capturadas das células transduzidas com Adp16 ou Adp53 também não foi detectada a presença da proteína pRb fosforilada. Lado a lado nas mesmas imagens podemos observar células não transduzidas que estão exibindo a marcação positiva para a forma fosforilada de pRb, servindo como um controle interno do ensaio de imunocitoquímica.

Estes resultados indiretamente sugerem o resgate do controle do ciclo de divisão imposto pela expressão dos CDKs p16 e p21 (este último como efetor de p53). A expressão de p16 e p53 causa a inibição da atividade quinásica das CDKs de pRb, agora pRb hipofosforilada pode seqüestrar os fatores E2Fs e inibir a progressão do ciclo de divisão celular.

Figura 14: Integridade funcional do elemento IRES e da proteína p53 selvagem mediada pelo vírus Adp53 e Adp16IRESp53. A: Análise em citometria de fluxo mostrando aumento da intensidade de fluorescência de eGFP nas células H358^{pCLPGEGFP} 48 horas após transdução com Adp53 e Adp16IRESp53. Os resultados representam valores médios $\pm$ D.P. entre duas determinações. B: Determinação por PCR em tempo real do aumento da quantidade do transcrito de p21 nas células H358 após tratamento com Adp53 e Adp16IRESp53, em relação ao valor normalizado das células tratadas com AdLacZ (valor igual a 1). Observamos aumento 6x e 1,9x na quantidade do transcrito de p21 nas células tratadas respectivamente com Adp16IRESp53 e Adp53. A análise representa valores médios $\pm$ E.P. entre três determinações. C: Imunocitoquímica mostrando a co-expressão das proteínas p21 e p53 nas células H358 transduzidas com Adp53 e Adp16IRESp53. As células H358 tratadas com AdLacZ ou Adp16 apresentaram fraca marcação para p21. 1: núcleo marcado com Hoechst 33342 (excitação de 364nm), 2: células identificadas com anticorpo α -p21 (excitação de 594nm) e 3: sobreposição das imagens 1 e 2.

Figura 15: Cinética de inibição E2F e redução de pRb fosforilado nas células H358^{Adp16}, H358^{Adp53}, H358^{Adp16IRESp53}. A: Histogramas representativos dos tempos de 4, 12, 20, 28, 36 e 48 horas, mostrando a partir de 28 horas reduzida presença de E2F após transdução viral com Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53. A análise representa média $\pm$ D.P. do ensaio em triplicata, B: Imagens de microscopia confocal do ensaio de imunocitoquímica confirmam a ausência da proteína pRb fosforilada em células transduzidas com Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53 (setas brancas)

5.7 Análises funcionais *in vitro* do efeito da reposição simultânea de p16 e p53 nas células H358 mediada pelos vírus Adp16IRESp53

5.7.1 Cinética de proliferação das células H358^{Adp16}, H358^{Adp53} e H358^{Adp16IRESp53}

A figura 16 mostra curvas de crescimento das células H358 não transduzidas (*mock*), transduzidas com o vírus controle AdeGFP e com os adenovírus mono e bi-supressor de tumor. Inicialmente, observamos que não existe diferença estatística significativa entre as curvas de crescimento das células H358 não transduzidas e H358 transduzidas com AdeGFP. Este dado mostra que a transdução com vetor adenoviral não interfere com a proliferação das células H358 e nos permitiu comparar a cinética de crescimento das células H358 transduzidas com Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53 com a curva de proliferação das células H358^{AdeGFP}. Verificamos que as células H358^{Adp53} sofreram uma redução na cinética de proliferação em comparação com as células H358^{AdeGFP}, o mesmo não ocorreu com as células H358^{Adp16} que não apresentaram diferença estatística significativa quando sua cinética de proliferação foi comparada com a das células H358^{AdeGFP}. A cinética de proliferação das células H358^{Adp16IRESp53} revelou uma intensa diminuição do número de células, quando comparada com as curvas derivadas de células H358^{AdeGFP}, H358^{Adp16} e H358^{Adp53}. Essa observação suporta a proposta de que a remediação simultânea de ambos os genes supressores de tumor p16 e p53, mediada pelo Adp16IRESp53 causa uma forte inibição da proliferação das células H358, sendo mais eficiente do que Adp53. As curvas de proliferação sugerem a seguinte ordem decrescente de eficiência dos adenovírus supressores de tumor sobre a proliferação das células H358: Adp16IRESp53 > Adp53 > Adp16.

5.7.2 Análise das fases do ciclo de divisão das células H358^{Adp16}, H358^{Adp53} e H358^{Adp16IRESp53}

Os resultados da análise das fases do ciclo celular: G1, S, G2/M e incluindo sub-G1, recolhidas no período de 24 a 72 horas após tratamento das células H358 com os vetores virais estão indicados na figura 17.

A denominada fase sub-G1 indica a presença de DNA celular fragmentado e serve como um importante indicativo de morte celular. A porcentagem de células

H358^{Adp16IRESp53} em sub-G1 foi elevada, atingindo valor de 70% após 48 horas de transdução. Na população de células coletadas 72 horas após a transdução, observamos os seguintes valores das porcentagens de sub-G1: 85%, 6%, 1,31%, 3,78% e 1,87%, respectivamente para as células H358^{Adp16IRESp53}, H358^{Adp53}, H358^{Adp16}, H358^{AdeGFP} e células não transduzidas. O Adp53 apesar de ter levado a morte apenas 6% das células tratadas, este resultado foi estatisticamente significativo, quando comparado com Adp16, AdeGFP e células não transduzidas (Figura 17A). Quanto à sub-G1, não observamos diferenças entre as células H358^{AdeGFP} e células não transduzidas. Esses dados suportam claramente a indicação do vírus Adp16IRESp53 como potente indutor de morte nas células H358.

Análise das porcentagens de células na fase G1 indicou que o vetor adenoviral Adp16 teve um forte efeito sobre esta fase do ciclo celular. Quarenta e oito horas após a transdução observamos 81,55% de células H358^{Adp16} na fase G1, enquanto que nas células H358^{Adp16IRESp53} observamos apenas 9,77% da população em G1. Células H358 não transduzidas, transduzidas com AdeGFP ou Adp53 apresentaram valores iguais a 44,9%, 38% e 53%, respectivamente (Figura 17B). A porcentagem de células em G1 presente na população H358^{Adp53} possui diferença significativa com relação às células H358^{AdeGFP}, o mesmo não ocorreu com as células H358 não transduzidas e H358^{AdeGFP} quando comparadas entre si. Estes dados mostram que apesar da presença de p16 no vetor Adp16IRESp53, as células H358 não respondem à configuração bicistrônica com parada em G1, como ocorre com o vetor monocistrônico Adp16.

Na fase S do ciclo de divisão ocorre a replicação do DNA e a determinação do número de células em S é uma clássica medida de proliferação celular. Inicialmente, não observamos diferenças na porcentagem de células na fase S entre as condições H358 não transduzida (16,06%) e H358^{AdeGFP} (14,44%) após 72 horas de transdução, reforçando a observação de que veículo adenoviral de transferência gênica não afeta a proliferação das células H358. Os valores obtidos para as porcentagens de células transduzidas com Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53 na fase S foram de 5,97%, 3,62% e 0,57%, respectivamente. Estes valores são bem menores do que os obtidos com as células controles H358^{AdeGFP} e H358 não transduzida indicando que todos os três adenovírus supressores de tumor diminuem a população de células na fase S. A quantificação da fase S mostra que Adp53 reduz quase duas vezes mais a população de células em S do que Adp16. Enquanto

que a expressão concomitante de p16 e p53 promovida pelo Adp16IRESp53 foi seis vezes mais eficiente em reduzir a porcentagem de células em S do que Adp53 (Figura 17C).

Análise da população de células H358 na fase G2/M após 48 horas de transdução com os adenovírus H358^{Adp16}, H358^{Adp53}, H358^{Adp16IRESp53}, H358^{AdGFP} e H358 não transduzida revelou as porcentagens de 6,83%, 35,73%, 8,44%, 35,17% e 21,72%, respectivamente. Avaliação conjunta dos dados obtidos para as populações em G2/M aponta que a administração dos vírus monocistrônicos Adp16 e Adp16IRESp53 reduz a porcentagem de células que atingem a etapa final da divisão celular (Figura 17 D).

Figura 16: Curva de crescimento das células H358 transduzidas com os vírus AdeGFP, Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53. Células analisadas no período entre 24 - 120hs após transdução. *Mock*: células não transduzidas. Os dados representam a média $\pm$ D.P. entre dois ensaios independentes feitos em triplicata. * $p \leq 0,05$ vs AdeGFP.

Figura 17: Curvas representando a cinética das fases do ciclo celular nas células H358 transduzidas com os vírus AdeGFP, Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53. Células analisadas em citometria de fluxo no período entre 24-72hs após transdução. A: Sub-G1, B: G1, C: S e D: G2/M, Mock: células não transduzidas. Os dados representam a média $\pm$ D.P. entre dois ensaios independentes feitos em duplicata. * $p \leq 0,05$ vs AdeGFP.

5.7.3 Análise comparativa entre transdução com vetor bicistrônico e co-transdução com vetores monocistrônicos: Adp16IRESp53 *versus* Adp16+Adp53

Este ensaio teve dois objetivos diferentes. O primeiro foi comparar duas formas distintas de transferência de p16 e p53: (a) utilizando a combinação de vetores monocistrônicos Adp16 e Adp53 para co-transferência gênica e (b) utilizando um único vetor adenoviral, Adp16IRESp53, para transferência simultânea de p16 e p53. O segundo objetivo envolveu a verificação da importância ou não da ordem de entrega dos genes supressores de tumor p16 e p53. A figura 18 resume os resultados obtidos com análise do ciclo celular das células H358 submetidas aos diferentes formas de administração dos genes terapêuticos. Nestes ensaios tomamos o cuidado de utilizar a mesma carga viral para todas as amostras e quando necessária a carga foi completada com o AdLacZ.

Resultados da comparação de transferência simultânea dos genes p16 e p53 utilizando dois vetores adenovirais, dois monocistrônicos ou um bicistrônico, revelaram a marcante superioridade do vírus Adp16IRESp53 na indução de morte celular. Noventa e seis horas após a transferência do cassete bi-supressor de tumor, 88,45% das células H358 estavam acumuladas na fase Sub-G1, em comparação com apenas 2,75% das células transduzidas simultaneamente (co-transdução) com os vírus Adp16 e Adp53.

Nos regimes de dupla transdução observamos um ligeiro aumento (3,54%) na porcentagem de células na fase Sub-G1 quando Adp53 foi administrado 48 horas depois de Adp16, em relação com a situação inversa, Adp53 seguido de Adp16 (2,20%). Enquanto que os valores para Sub-G1 induzidos após o tratamento com um único vírus supressor foram de 2,18% e 2,17% para Adp53 e Adp16, respectivamente.

As análises das fases G1, S e G2/M do ciclo celular após 96 horas de transdução foram realizadas apenas nas células submetidas aos protocolos de co- e dupla transdução. De modo geral, observamos que o Adp16 prossegue com seu efeito de induzir parada em G1 independentemente do protocolo de transferência, a única exceção foi para a administração via vetor bicistrônico. Quando Adp16 foi administrado sozinho ou no regime de co-transdução (Adp16+Adp53), obtivemos os valores de 67,66% e 62,04%, respectivamente de células em G1 (Figura 18).

A diminuição do número de células na fase S foi maior nas células transduzidas com Adp53 sozinho, Adp53 seguido de Adp16, Adp16+Adp53 e Adp53 seguido de AdLacZ do que células transduzidas com Adp16 sozinho, Adp16 seguido de AdLacZ e Adp16 seguido de p53 (Figura 18). Estes dados indicam que a administração de p53 é importante para a redução da proliferação celular. Em relação à fase G2/M destacamos um ligeiro aumento na população das células que receberam Adp53 independentemente do protocolo de transdução.

Em suma, esse ensaio nos mostra que a transferência de p16 e p53 simultânea do vetor adenoviral Adp16IRESp53 é mais eficiente agente antiproliferação do que a transferência destes genes separadamente via dois vetores monocistrônicos. Observamos que p16 e/ou p53 nas versões monocistrônicas também revelaram efeito supressor de proliferação, mas que difere do efeito do bicistrônico; por exemplo, Adp16 sempre direcionando para o bloqueio do ciclo celular em G1 e Adp16IRESp53 promovendo a morte celular. Este conjunto de dados sugere que quando se aplica a estratégia de transferência de múltiplos genes é importante considerar o desenho do veículo de transferência e a ordem de administração dos transgenes quando entregues por vetores independentes.

Adicionalmente, a figura 18C exibe resultados de imunofluorescências de células H358 co-transduzidas com os adenovírus Adp16 mais Adp53. Visualizamos células expressando apenas uma das proteínas transgênicas, apenas p16 (fluorescência vermelha) e células marcadas para ambas as proteínas na mesma célula, p16 (fluorescência vermelha) e p53 (fluorescência verde). Estas imagens mostram que a população de células resultantes da co-transdução com os dois vírus monocistrônicos Adp16 e Adp53 é heterogênea, ou seja, células que expressam ambos ou apenas um dos transgenes.

Figura 18: Análise do efeito da co-transdução Adp16+Adp53 versus Adp16IRESp53 das células H358 após 96hs de transdução. A: Porcentagem de células em cada fase do ciclo celular após co-transdução e transdução simples com os vetores monocitrônicos ou com o vetor bicitrônico. *Mock*: células não transduzidas. Dados representam média $\pm$ DP entre dois ensaios independentes feitos em duplicata, B: Perfil representativo do *software Cell Quest* demonstrando os picos do conteúdo de DNA em diferentes fases do ciclo, C: Imagens da microscopia confocal do ensaio de imunocitoquímica de células transduzidas com Adp16+Adp53. A seta indica célula foi transduzida apenas com Adp16 e a esquerda célula co-transduzida com ambos Adp16 + Adp53. 1- campo claro, 2- células identificadas com anticorpo α -p53 (excitação de 488nm) 3- células identificadas com anticorpo α -p16 (excitação de 594nm), 4- sobreposição das imagens 2 e 3.

5.7.4 Alterações na morfologia e análise da senescência das células H358^{Adp16}, H358^{Adp53} e H358^{Adp16IRESp53}

Mudanças na morfologia celular servem como indicadores de senescência, perda de viabilidade e morte celular. A figura 19B mostra o aspecto morfológico e a revelação positiva para o marcador de senescência (SA- β Gal) nas células H358^{Adp16} e H358^{Adp53}, mostrando uma imagem característica de células senescentes: grandes, com formato *flat*. A figura 19A classifica as diferentes populações de células quanto ao seu tamanho. Observamos a presença de um número maior de células grandes na população tratada com Adp16 (84%) e Adp53 (63%), enquanto que na população de células transduzidas com Adp16IRESp53 ocorreu o oposto, aumentou o número de células médias/pequenas (correspondente a 70%), indicando perda de viabilidade celular.

5.7.5 Análise da apoptose nas células H358^{Adp16}, H358^{Adp53} e H358^{Adp16IRESp53}

A figura 20 mostra que Adp16IRESp53 provoca morte celular dependente de caspase-3. Realizamos medidas de atividade de caspase entre de 1 à 48 horas após transdução. Verificamos na 28^a hora um pico acentuado da atividade de caspase-3 nas células H358 transduzidas com Adp16IRESp53, em comparação com células não transduzidas, AdLacZ, Adp16, Adp53. Sempre em relação aos controles, neste instante o adenovírus Adp53 mostrou um ligeiro aumento na atividade de caspase-3. Curiosamente, Adp16 apresentou uma discreta diminuição na atividade de caspase 3, a qual pode estar relacionada com o intenso bloqueio na fase G1 do ciclo celular induzido por este adenovírus.

Figura 19: Análise da indução de medidas de tamanho e senescência das células H358^{Adp16}, H358^{Adp53} e H358^{Adp16IRESp53}. A: Resultado da distribuição de células por tamanho obtido com o aplicativo *CellQuest* FSC (tamanho celular) x SSC (granulosidade celular). Adp16 e Adp53 causam aumento do tamanho celular, enquanto Adp16IRESp53 reduz o tamanho celular, B: Imagens do ensaio de senescência capturadas em microscopia de contraste de fase (200x) mostrando que Adp16 e Adp53 provocam senescência celular (presença da enzima β -galactosidase), indicadas por coloração azul. *Mock*: células não transduzidas

Figura 20: Adp16IRESp53 provoca morte celular dependente de caspase-3. Após 28 horas de transdução, foi determinada a atividade de caspase-3 nas células H358. Histograma compara a atividade de caspase-3 (colunas escuras) entre os diferentes tratamentos com os adenovírus supressores de tumor. As células transduzidas com Adp16IRESp53 apresentaram um aumento 3 vezes superior com relação as células transduzidas com AdLacZ. As colunas brancas representam os resultados de inibição de caspase-3 por AC-DEVD-CHO. *Mock*: células não transduzidas. A análise representa média $\pm$ D.P. do ensaio feito em triplicata.

5.7.6 Análise transcricional dos genes endógenos MDM2 e Bax nas células H358 após tratamento com os vetores adenovirais Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53

Analizamos os transcritos de alguns genes endógenos conhecidos por estarem relacionados com a expressão e função de p53, são eles: MDM2, SVV, Bax e FoxO. Todas as medidas quantitativas foram normalizadas em relação à expressão do gene de interesse nas células H358 transduzidas com AdLacZ.

Nossos resultados mostram que 36 horas após a transdução com o vírus Adp16IRESp53 a quantidade do transcrito de MDM2 aumentou em 18,17 vezes contra um aumento igual a 10,75 vezes nas células transduzidas com Adp53. Nas células transduzidas com Adp16 observamos uma diminuição do transcrito de MDM2 (Figura 21A).

Bax é um fator pró-apoptótico ativado por p53 e o tratamento com o vírus Adp16IRESp53 causou um aumento de cerca de 5 vezes no transcrito de Bax. Esta observação confirma que a via de apoptose, mediada por BAX, participa da extensa morte celular induzida pelo adenovírus bicistrônico (Figura 21B).

O gene SVV tem função anti-apoptótica e sua ativação está relacionada com resistência ao tratamento do câncer e pobre prognóstico para o paciente. O gene SVV faz parte da família dos inibidores de apoptose (IAP) (Li e Brattain, 2006). O gene FoxO pertence à família dos fatores de transcrição *forkhead*, envolvidos com várias funções biológicas, incluindo diferenciação celular, bloqueio do ciclo celular, reparo do DNA e desintoxicação de espécies reativas de oxigênio. Observamos redução nos níveis de expressão dos transcritos de SVV e FoxO nas células tratadas tanto com os vírus na configuração mono-supressora de tumor quanto com o vírus bi-supressor de tumor (Figura 22). Estes resultados sugerem que a reparação dos genes p16 e p53 também afeta outros eventos da vida das células, não apenas a proliferação, mas também os eventos relacionados com resposta ao estresse e longevidade.

Figura 21: Quantificação relativa da expressão MDM2 e Bax em células H358 após transdução viral. A: Comparando com o controle LacZ com valor normalizado igual a 1, a expressão de MDM2 está aumentada nas células tratadas com os vírus Adp53 e Adp16IRESp53 e diminuída nas células tratadas com Adp16, B: O transcrito de Bax parece com quantidade cinco vezes maior nas células transduzidas com Adp16IRESp53, do que nas células transduzidas com Adp16, Adp53 ou AdLacZ. A análise representa média $\pm$ E.P. do ensaio feito em triplicata.

Figura 22- Quantificação relativa dos transcritos de SVV e FoxO nas células H358 após transdução viral. SVV e FoxO estão menos expressos nas células tratadas com os vírus supressores de tumor Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53. A análise representa média $\pm$ E.P. do ensaio feito em triplicata.

5.7.7 Análise do efeito dos vetores adenovirais Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53 no ciclo e morte celular na linhagem de adenocarcinoma pulmonar humano A549

A figura 23 A mostra os resultados da análise de ciclo e morte celular após 72 horas de transdução das células A549, p53 positiva, com os vírus AdLacZ, Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53. Verificamos que o tratamento das células H358 com adenovírus Adp16 ou Adp16IRESp53 provocou um aumento do número de células na fase G1 do ciclo celular, 56% e 55%, respectivamente, quando comparados com o valor obtido para as células tratadas com AdLacZ (44%). As células tratadas com Adp53 apresentaram resultados semelhantes aos da amostra controle. Não foram observadas diferenças significantes entre as populações de células nas fases Sub-G1, S e G2/M dos diferentes tratamentos.

A figura 23B mostra resultados de ensaios de viabilidade e morte celular realizadas nas células A549 após 72 horas de tratamento com os vírus. Esse ensaio identifica células apoptóticas com base em alterações na permeabilidade da membrana celular aos corantes fluorescentes Yo-Pro (fluorescência verde) e Iodeto de Propídeo (fluorescência vermelha). As células apoptóticas são marcadas com fluorescência verde e as células necróticas marcam com a cor vermelha, enquanto que as células que apresentam marcação verde e vermelha são consideradas na fase tardia da apoptose e a população de células vivas não é corada. O tratamento com Adp16IRESp53 significativamente reduziu a viabilidade celular, atingindo um valor de 58,5% de células vivas, contra valores de 75,95%, 78,97%, 76,73% e 81% promovidos pelos vírus Adp16, Adp53, AdLacZ e as células não transduzidas. As porcentagens totais de células mortas (apoptose + necrose) foram de 22,61%, 19,22%, 37,57%, respectivamente para as células A549^{Adp16}, A549^{Adp53} e A549^{Adp16IRESp53}. Nas células A549^{AdLacZ} e A549 não transduzidas obtivemos 21,20% e 17% de células mortas, respectivamente. O conjunto de dados coletados com o ensaio de viabilidade e morte celular das células A549 transduzidas com os vírus monocistrônicos e bicistrônico indica que o vetor adenoviral Adp16IRESp53 é a melhor estratégia de supressão tumoral.

Figura 23: Análise de ciclo e morte celular das células A549Adp16, A549Adp53 e A549Adp16IRESp53, 72 horas após a transdução.

A: Histograma indicando a distribuição de células nas fases do ciclo celular. B: Ensaio de viabilidade e morte celular mostrando que Adp16IRESp53 dobrou o número de células mortas. *Mock*: células não transduzidas. Os dados do ciclo celular representam a média $\pm$ D.P. entre dois ensaios independentes feitos em duplicata, os resultados do ensaio de viabilidade e morte celular são médias entre triplicatas * $p \leq 0,05$ vs AdLacZ.

5.8 Tratamento *in vivo (in situ)* dos tumores derivados de H358 com os vírus supressores de tumor Adp16, adp53 e Adp16IRESp53

A figura 24 mostra a distribuição da proteína marcadora β -galactosidase nos tumores de H358 desenvolvidos no subcutâneo de camundongos *nude*, 48 horas após o tratamento *in situ* com o vírus AdLacZ. Observamos com o auxílio do vírus marcador AdLacZ que o sistema de vetores adenovirais que construímos pode transduzir *in vivo (in situ)*.

Para avaliar o efeito inibidor do crescimento tumoral no modelo xenográfico, os animais inoculados com células H358 foram divididos em quatro grupos e cada um recebeu um tratamento adenoviral diferente. Observamos clara diferença entre as curvas de crescimento dos tumores que receberam os vírus Adp16, Adp53 ou Adp16IRESp53 quando comparados com a curva de crescimento do grupo controle tratados com AdLacZ (Figura 25). No 28º dia após a administração viral, a média para o volume tumoral do grupo controle foi igual a 803mm³ contra 254, 259 e 171mm³, respectivamente para os grupos tratados com Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53. Comparando os resultados em volume relativo, verificamos que o tratamento dos tumores não tratados com os genes terapêuticos, aumentou em 17 vezes no período de 28 dias, enquanto que os tumores tratados com os genes p16 ou p53 aumentaram 5,6 vezes. Resultado marcante foi encontrado no grupo de animais que recebeu o vírus Adp16IRESp53. O volume de tumor desse grupo apenas duplicou no período de 28 dias. Este conjunto de dados indica que o tratamento dos tumores de H358 com adenovírus bicistrônico, reduziu drasticamente o crescimento tumoral supõe uma desaceleração da velocidade de proliferação dos tumores. Análises estatísticas realizadas com dados do tempo final da curva de crescimento (*End point*) revelaram que em nosso modelo xenográfico o tratamento com Adp16 e Adp53 não apresentou diferença significativa quando comparados entre eles, entretanto, exibiram diferença em relação ao Adp16IRESp53. Cálculos do tempo de dobramento revelaram que os tumores tratados com AdLacZ dobraram de tamanho em 4,6 dias. Os tumores tratados com os vírus monocistrônicos Adp16 e Adp53 precisam de 10 e 11 dias, respectivamente para dobrarem de tamanho. O volume dos tumores tratados com o vírus Adp16IRESp53 leva 18,5 dias para duplicar. Estimativas do retardo do crescimento dos tumores pelo cálculo de TGD e

%TGD mostram que o crescimento dos tumores controle leva 26 dias para atingirem o volume máximo de corte (*end point* de 800mm³). Os tumores com Adp16 e Adp53 levam 47 e 49,5 dias, respectivamente, enquanto que nos tumores tratados com Adp16IRESp53 esse valor é de 60 dias. Explorando esses dados na porcentagem de TGD, obtivemos os valores de 0%, 80,7%, 90% e 130,7%, respectivamente para os grupos tratados com AdLacZ, Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53. Quanto à manifestação de um quadro de regressão parcial e estabilidade tumoral, observamos que 7 dos 10 animais tratados com Adp16IRESp53 apresentaram estabilidade do crescimento tumoral, sendo que 3 animais também exibiram regressão parcial do tumor. Dos 10 animais de cada grupo tratado com Adp16 e Adp53, 2 e 3 animais, respectivamente exibiram estabilidade tumoral.

A figura 26 ilustra fotomicrografias de preparados histológicos corados com HE e marcação de TUNEL dos tumores de H358 após 72 horas de tratados com os adenovírus AdLacZ, Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53. Os resultados da marcação com TUNEL confirmam a presença de extensa região com células mortas no tumor que recebeu o adenovírus bi-supressor de tumor Adp16IRESp53. Regiões com células mortas e positivas para TUNEL também foram observadas nos tumores tratados com Adp53 e Adp16, o mesmo não ocorreu com os tumores tratados com AdLacZ.

Imagens de preparados histopatológicos corados com HE (Figura 27) confirmam a presença de figuras de mitose nos tumores de H358 que receberam o adenovírus AdLacZ, típicas de intensa atividade proliferativa. Nos preparados dos tumores tratados com os vírus Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53 observamos ausência de figuras de mitose, células com morfologia alterada e com fraca coloração, indicativos de um processo de destruição do tecido.

Este conjunto de resultados confirma que a diminuição do crescimento dos tumores de H358 resulta em morte das células tratadas com Adp16IRESp53.

Na tentativa de analisar a expressão dos transgenes p16 e p53 nos tumores de H358 tratados, realizamos ensaios de PCR em tempo-real. A figura 28 ilustra os gráficos que mostram a expressão dos transcritos de p16, p53 nos tumores tratados com Adp16 e Adp53 respectivamente e também a presença de ambos os transcritos nos tumores tratados com o vírus Adp16IRESp53. Concluimos que também *in vivo* (*in situ*) o adenovírus bicistrônico transfere e dirige a expressão dos cDNAs da dupla de supressores de tumor: p16 e p53.

Figura 24: Transdução *in vivo (in situ)* dos tumores derivados de H358 com AdLacZ: Fotomicrografias mostrando a presença de células expressando o gene LacZ após 48 horas de administração viral, A: controle negativo e B: tumor tratado com AdLacZ.

Figura 25: Curva de crescimento dos tumores H358 tratados com Adp16, Adp53, Adp16IRESp53 e o controle AdLacZ em modelo xenografico utilizando camundongos *nude*. Valores dos volumes relativos do crescimento tumoral ao longo de 30 dias. Os dados indicam média $\pm$ E.P. entre 7 – 10 animais por grupo.

Figura 26: Apoptose em cortes histológicos de tumores de H358 tratados com AdLac Z (controle negativo), Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53. Coloração com hematoxilina e eosina (H+E) imagens A-D e coloração de TUNEL imagens E-H. No tumor tratado com Adp16IRESp53 observamos extensa região com intensa marcação para a coloração de TUNEL, indicando a presença de células apoptóticas. No tumor tratado com Adp53 visualizamos uma pequena região com marcação fraca para coloração de TUNEL. Os tumores tratados com Adp16 e AdLacZ não exibiram regiões positivas para coloração de TUNEL.

Figura 27: Cortes histológicos dos tumores de H358 desenvolvidos no subcutâneo de camundongos nudes e tratados com os adenovírus AdLacZ (controle), Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53. Os tumores foram removidos 3 dias após a administração dos vírus adenovírus AdLacZ (controle), Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53. A seta azul indica uma figura de mitose típica nas amostras dos tumores tratados com AdLacZ. Observamos figuras apoptóticas (setas vermelhas) nos tumores tratados com Adp53 e Adp16IRESp53, confirmando a indução de morte celular. Nos tumores tratados com Adp16 observamos ampla região com células alargadas (seta verde), sugerindo senescência. Os tumores foram processados seguindo técnica histológica clássica, inclusão em parafina e corados com hematoxilina/eosina.

Figura 28: Análise da expressão gênica dos transcritos de p16 e p53 nos tumores H358 após 72 horas de transdução com AdLacZ, Adp16 e Adp16IRESp53: Gráfico representativo da análise de quantificação dos transcritos de PCR em tempo real – número de ciclos vs delta Rn (linha verde na horizontal representa o CT- *cycle threshold*). A: amplificação de p16 nos tumores transduzidos com Adp16 e Adp16IRESp53. B: amplificação de p53 nos tumores transduzidos com Adp53 e Adp16IRESp53. Observar em A e B a ausência de amplificação dos genes p16 e p53 no tumor transduzido com AdLacZ.

6 DISCUSSÃO

Com o advento da identificação das mutações presentes no genômica das células tumorais, o tratamento de células com genes defeituosos, terapia gênica, tornou-se uma possibilidade terapêutica possível e a ser considerada em conjunto com os tratamentos anticâncer convencionais. A remediação de genes reguladores negativos do ciclo celular é uma das mais lógicas estratégias para frear a proliferação descontrolada das células tumorais. Entre os inibidores da divisão mitótica, os genes p16^{INK4a} e p53 se apresentam como potentes efetores da supressão tumoral e fortes candidatos para aplicação em protocolos de terapia gênica (Sharpless *et al.*, 2002).

Os primeiros resultados descrevendo o efeito da reparação dos genes p16^{INK4a} e p53 foram publicados por Sandig *et al.*, 1997. A co-transferência dos adenovírus p16^{INKa} e p53 para células derivadas de carcinoma hepatocelular e carcinoma de mama mostrou que a expressão de ambos os genes supressores cooperam com a inibição do crescimento tumoral. Modesitt *et al.*, 2001 estudando linhagens de carcinoma de ovário relataram que a remediação de Adp16 foi melhor supressor do que a co-transdução Adp16+Adp53. Câncer pancreático foi abordado por Ghaneh *et al.*, 2001 que demonstraram o efeito de parada do ciclo celular *in vitro* e *in vivo* após co-transdução com Adp16+Adp53. Em 2002, Rui e Su apresentaram que a co-transdução Adp16+Adp53 *in vitro*, foi mais eficiente na inibição da proliferação de células derivadas de leucemia humana.

Discutidos na sequência, apresentamos resultados que suportam a hipótese de que um efeito mais completo de inibição da proliferação tumoral pode ser alcançada quando utiliza-se um único vetor adenoviral – Adp16IRESp53 – como veículo para reposição de p16 e p53, em células derivadas de carcinoma pulmonar como modelo experimental. Câncer de pulmão é agressivo, a sobrevida é menor do que 15% para os pacientes tratados com quimioterapia, radioterapia e cirurgia. Nos tumores de células não-pequenas de pulmão (NSCLC) a cirurgia é o procedimento mais indicado, mas menos do que 50% dos pacientes são curados (Toloz *et al.*, 2006).

6.1 Análise do efeito funcional da combinação bicistrônica Adp16IRESp53 em modelo de câncer pulmonar *in vitro*

Para atingir o objetivo de avaliar o efeito da combinação dos genes p16^{INK4a} e p53 *in vitro* e *in vivo*, o trabalho iniciou-se com a construção do vetor adenoviral bicistrônico Adp16IRESp53. Como vetores comparativos também foram construídos os monocistrônicos Adp16, Adp53 e os controles experimentais AdeGFP e AdLacZ.

As preparações virais foram seguidas de cuidadosas análises, incluindo a purificação e titulação. O método de titulação mais comum foi recomendado em 1998 pelo FDA *Guidance on Human Somatic Cell Therapy and Gene Therapy* é a medida da absorbância em 260nm, após lise das partículas virais. Porém, esses valores dependem das metodologias de purificação e concentração adotadas particularmente por cada laboratório. Atenção também deve ser dirigida ao número de partículas infectantes presentes na preparação viral, a qual possui o impacto direto na eficácia e segurança dos protocolos clínicos experimentais de terapia gênica. Hutchins *et al.*, 2000 destacaram a necessidade de padronização de um protocolo de titulação adenoviral que deveria ser seguido por todos os laboratórios a fim de poderem compartilhar e comparar resultados. Atualmente, dentro desta linha, o título biológico é recomendado e considera que para um lote de adenovírus ser aceitável dever ter proporções entre partículas totais e partículas infectantes da ordem de 1:100 ou menos.

Nossas preparações adenovirais apresentaram proporções entre título biológico e físico da ordem de 1:10 e 1:30 (Tabela 5). A titulação biológica foi realizada pelo método de unidades de efeito citopático/mL (CPEU/mL). A metodologia desse ensaio foi detalhadamente descrita em Nyberg-Hoffman *et al.*, 1997 que realizaram uma extensa análise comparativa entre o ensaio clássico de formação de placa e o de unidades de efeito citopático. A análise abordou efeitos de volume, força centrífuga, tempo de transdução e coeficientes de sedimentação e difusão. Estes autores concluíram que a determinação dos títulos adenovirais em CPEU/ml é um método mais reproduzível e sensível. Esse método também foi utilizado no monitoramento da quantidade de partículas virais em fluídos biológicos de pacientes submetidos a protocolos experimentais de terapia gênica do câncer, tratados com adenovírus carreando p53 (Fujiwara *et al.*, 2006).

Durante nossas produções virais, houve a preocupação da possível presença de vírus competentes de replicação (RCA), fato relatado na literatura com o uso de adenovírus de primeira geração (Chuah *et al.*, 2003). Em nossas preparações virais, isso não ocorreu, demonstrando segurança do protocolo de produção viral (Figura 9).

O passo seguinte do trabalho foi analisar a expressão gênica de p16 e p53 em células derivadas de carcinoma pulmonar H358 após transdução com os vetores adenovirais. Resultados de RT-PCR, *Western Blot* e imunocitoquímica confirmaram a expressão dos transgenes p16 e p53 (Figuras 11, 12 e 13).

Resultados da análise de imunocitoquímica revelaram a presença de p16 também no citoplasma celular (Figura 12), p16 exerce sua função no núcleo de células normais (Lukas *et al.*, 1995; Bartkova *et al.*, 1996). Nilsson e Landberg, 2006 mostraram que p16 sofre modificações pós-traducionais e além de ocupar o núcleo celular, também aparece no citoplasma com atividade funcional, ou seja, inibindo a formação do complexo ciclina D/CDK4-6. Na tentativa de analisar de forma mais detalhada o compartimento celular ocupado pela proteína p16 transduzida pelos vetores adenovirais, procedemos análises de cortes seriados das imagens de microscopia confocal. Estas análises mostram que o p16 também ocupa o núcleo celular. Frente aos resultados do efeito de Adp16 sobre o ciclo celular das células H358 obtidos nesse trabalho (Figura 17) é nítida a participação de p16 no bloqueio da fase G1 do ciclo celular. De forma indireta, os resultados da inibição de E2F e a falha em detectar a proteína pRb fosforilada também sugerem a inibição do complexo ciclina D/CDK4-6 pela proteína p16 transduzida a partir de Adp16.

Começamos a investigar o efeito da remediação simultânea de p16 e p53 construindo curvas de crescimento e análises de ciclo celular da linhagem H358 tratada com o conjunto de adenovírus supressores de tumor. A transdução com o Adp16IRESp53 promoveu uma nítida diminuição no número de células vivas (85% de células no grupo Sub-G1) e este fato foi projetado na curva de crescimento como sensível bloqueio de proliferação celular. Huang *et al.*, 2003 também observaram um acúmulo de células em Sub-G1 (45,8%) após tratamento de células derivadas de câncer de cólon com o adenovírus bicistrônico Adp14IRESp53. Nossos resultados em conjunto com os descritos por Huang *et al.*, 2003 reforçam a proposta de que a reparação de dois genes supressores de ciclo celular é necessária para levar a morte e/ou bloqueio da proliferação do maior número possível de células tumorais.

Diante dos trabalhos da literatura que utilizaram a estratégia da co-transdução nos perguntamos se poderia haver diferença no efeito final quando recorremos aos regimes de co-transdução (Adp16+Adp53), comparado à entrega bicistrônica (Adp16IRESp53). Os dados de imunocitoquímica (Figura 18) do regime de co-transdução nos revelam que os genes p16 e p53 estão expressos na mesma célula, porém, o efeito sinérgico da combinação de p16/p53 correspondente ao efeito de morte ocorreu quando foram entregues por um único vírus. Determinações das porcentagens de células mortas sugerem que há considerável diferença entre os regimes e veículos de transdução (Figuras 18A e 18B). Esses resultados são interessantes, uma vez que mesmo apresentando ambos os genes, as células H358 co-transduzidas com Adp16+Adp53 responderam com parada do ciclo celular em G1 (62%) e G2/M (22%). A administração dos genes supressores de tumor p16 e p53 veiculada por vetores distintos têm ação antiproliferativa menor do que o veículo bicistrônico. Este efeito pode ser atribuído em parte a distribuição heterogênea dos transgenes p16 e p53 nas células H358 co-transduzidas, enquanto o vírus Adp16IRESp53 causa um conflito entre a presença simultânea de p16 e p53, o qual culmina com vasta indução direta de morte celular.

A reparação individual de p53 nas células H358, após 48 horas de transdução, mostrou apenas 3% da população em Sub-G1 (Figura 17A). Estes resultados diferem dos publicados por Pearson *et al.*, 2000, que encontraram 30% de células H358 em Sub-G1 após transdução com Adp53. A principal diferença entre estes estudos está na quantidade de vírus utilizada. Nós aplicamos 50 CPEU por célula enquanto que Pearson *et al.*, 2000 trabalharam com 70 PFU por célula. Possivelmente, a diferença entre os valores das MOIs e os métodos de titulação podem estar interferindo na comparação dos resultados.

Na tentativa de monitorar de forma indireta a inibição do fator de transcrição E2F e conseqüentemente a ativação (hipofosforilação) de pRb, utilizamos o lentivírus pFE2FLW, que serve como sensor da atividade de E2F. A queda da atividade de luciferase reflete a diminuição na quantidade de E2F livre, efeito da presença da proteína pRb na forma hipofosforilação que passa a seqüestrar os fatores E2Fs. Ambos Adp16 e Adp53 causaram uma redução na atividade de E2F e Adp16IRESp53 levou a forte inibição da atividade de luciferase, reflexo da queda do nível de E2F ativos (Figura 15A). Imagens dos preparados de imunocitoquímica

onde utilizamos um anticorpo que reconhece apenas a forma fosforilada de pRb, revelaram claramente a presença do sinal de fluorescência para marcação da forma fosforilada de pRb apenas nas células H358 transduzidas com AdLacZ. A forma fosforilada de pRb não foi visualizada nas células H358 transduzidas com o adenovírus Adp16IRESp53 (Figura 15B). Estes dados em conjunto com a redução da população de células na fase S, sugerem que o resgate do controle do ciclo de divisão imposto pela expressão dos CDKIs p16 e p21 (este último como efetor de p53) causa a inibição da atividade quinásica das CDKs de pRb e agora pRb hipofosforilada passa a sequestrar os fatores E2Fs, impedindo a progressão do ciclo de divisão celular.

Um dos principais mecanismos antiproliferativos é a indução de senescência celular, que também está relacionada com a expressão dos CDKIs p16^{INK4a} e p21^{WAF1} e a inibição da fosforilação de pRb. Células senescentes em cultura são identificadas pelo tamanho aumentado, morfologia alargada, ausência de síntese de DNA, presença de vacúolos e ativação da enzima β -galactosidase, identificada pelo ensaio colorimétrico usando X-gal como substrato em pH 6.0 (Dimri *et al.*, 1995). Nossos resultados indicaram que o tratamento com Adp16 promove a instalação do programa de senescência com grande intensidade, enquanto que o Adp53 tem um efeito mais moderado (Figura 19). Essas indicações corroboram com resultado de ciclo celular discutido anteriormente e enfatizam a função de Adp16 como promotor de senescência, enquanto que a indução em G2/M de parte da população de células H358^{Adp53} consiste com seu papel de controlador dos *checkpoints* de divisão celular, prevenindo replicação do DNA.

A principal função dos genes supressores de tumor relevantes para o tratamento do câncer é a indução de morte celular. Inúmeros estudos relatam diferentes tipos de morte: apoptose, autofagia, necrose, catástrofe mitótica, *anoikis* e eventos como excitotoxicidade e degeneração Walleriana (do inglês *Wallerian degeneration*) – menos caracterizados, ocorridos em neurônios e, cornificação – tipo de morte verificada na epiderme, especificamente em queratinócitos (Kroemer *et al.*, 2005).

Com a detecção de células inviáveis (mortas), representada pela população em Sub-G1, procuramos analisar o mecanismo de apoptose como causa da destruição celular induzida pelo adenovírus bicistrônico. Avaliamos a presença do efetor final da via de apoptose – caspase-3 (Figura 20) no período entre 1 – 48 horas

após transdução. Resultados da cinética de ativação de caspase-3 nas células H358 mostraram que 28 horas após transdução com Adp16IRESp53 houve aumento da atividade de caspase-3, demonstrando o processo de apoptose dependente de caspase.

Avaliação adicional do pequeno perfil transcricional de genes especificamente relevantes para o sistema de controle do ciclo celular de células H358 tratadas com os genes terapêuticos p16^{INK4a} e p53, nos indicou uma análise mais extensa dos mecanismos moleculares envolvidos na combinação p16/p53. Observamos nas células H358^{Adp16IRESp53} expressiva quantidade para o transcrito do gene pró-apoptótico Bax. Também verificamos aumento dos transcritos de p16, p53, p21 e MDM2 nas células H358^{Adp16IRESp53}. Mecanismos similares aos nossos foram observados por Huang *et al*, 2003. Os autores demonstraram um acúmulo de p53 em células de câncer de cólon após transdução com adenovírus bicistrônico carreando os genes p14^{ARF} e p53. Também verificaram a expressão aumentada dos genes correlatos MDM2 e p21^{CIP1}.

O gene anti-apoptótico *survivin* (SVV) não é detectável na maioria dos tecidos normais, mas, é expresso em altíssimos nível nos tecidos tumorais. Hoje, SVV é utilizado como um importante indicador de prognóstico para diversos tumores humanos (Stauber *et al.*, 2007). Análise da expressão de SVV nas células H358 transduzidas com os vírus supressores de tumor Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53 revelou uma diminuição na quantidade do transcrito de SVV.

A expressão do fator de transcrição FoxO aumenta em situações de estresse e tem sido relacionado com aumento da longevidade do organismo (Brunet *et al.*, 2004). Nossas análises sugerem que o mecanismo de sobrevivência desencadeado por FoxO pode ser bloqueado pelos vírus supressores de tumor Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53, mas os os prováveis mecanismos envolvidos entre FoxO e os genes p16 e p53 ainda não estão descritos. Recentemente, Katayama *et al.*, 2008 demonstraram o envolvimento do fator de transcrição FoxO no bloqueio em G1 do ciclo celular via transcrição dos genes da família INK4, p15^{INK4b} e p19^{INK4d} e a inativação da via de sinalização Akt.

Nossos resultados mostrando a ativação de Bax e MDM2 em conjunto com a inibição de SVV e FOXO decorrentes do tratamento com os adenovírus Adp16,

Adp53 e Adp16IRESp53 são compatíveis com a função anticâncer atribuída para estes candidatos a vetores terapêuticos.

Com o objetivo de ampliar a avaliação do efeito da combinação bicistrônica em células de carcinoma de pulmão com diferentes perfis mutacionais, realizamos alguns ensaios na linhagem de carcinoma de células não-pequenas de pulmão, denominada A549, que possui o gene p53 selvagem. Observamos que o arranjo bicistrônico entre p16 e p53 foi mais eficiente em diminuir a viabilidade celular e parada do ciclo celular na fase G1. Adp16 promoveu parada na fase G1, enquanto Adp53 não alterou de modo significativo as fases do celular (Figura 23). Nossos dados sugerem que a expressão ectópica de p53 selvagem em células que já possuem p53 normal, possivelmente encontra mais barreiras para eficiente inibição do ciclo de divisão, ou seja, as células tumorais com p53 selvagem já possuem mecanismos endógenos de inibição de p53, como amplificação de MDM2, por exemplo.

Nossa breve abordagem de morte celular revelou considerável indução de morte provocada pelo vírus Adp16IRESp53 nas células A549. Um discreto aumento da porcentagem de células A549 mortas foi observado após transdução com Adp16 e resultados semelhantes foram descritos por Katsuda *et al.*, 2002 e Park *et al.*, 2003.

O conjunto de resultados das análises funcionais *in vitro* do efeito do vírus Adp16IRESp53 sobre a proliferação celular revela o forte impacto desta combinação gênica sobre o controle do ciclo celular. Em todos os experimentos, o efeito potencializado e sinérgico do arranjo bicistrônico de p16 e p53 foi evidente. Em nosso modelo de estudo foi demonstrado que a estratégia da entrega simultânea dos genes p16 e p53 pode alcançar efeitos mais rápidos e completos sobre os programas de divisão e morte de células derivadas de carcinoma de pulmão humano H358 e A549.

A figura abaixo esquematiza a ação dos genes p16 e p53 nas versões monocistrônicas e bicistrônica nas células H358.

Figura 29: Esquema simplificado do efeito *in vitro* de Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53 nas células H358. O efeito sinérgico dos genes p16 e p53 entregues por um único vetor adenoviral promove morte celular, enquanto que Adp16 e Adp53 isoladamente provocam parada da proliferação celular e senescência.

6.2 Validação *in vivo* do efeito da configuração bicistrônica p16/p53 em tumores H358

Avaliação em modelo xenográfico de crescimento de tumores das células H358 em camundongos *nude* é uma etapa fundamental dos estudos voltada à identificação de candidatos a agentes terapêuticos, como é o caso dos vírus Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53. Diversas pesquisas experimentais do tratamento do câncer utilizam modelos xenográficos com camundongos *nude*. Mesmo sendo imunocomprometidos e a administração subcutânea não representar o ambiente original do tumor, o uso desses modelos animais é válido, além de representarem uma rara oportunidade para analisar o crescimento de tumores humanos. O *Nacional Cancer Institute* (NCI-EUA) recomenda os modelos xenográficos como ponto de partida para testes experimentais *in vivo* de novos medicamentos anticâncer.

Recentemente, Bazan-Peregrino *et al.*, 2008 demonstraram um trabalho importante de verificação da distribuição das partículas virais após injeção intratumoral e analisaram a eficiência de transdução comparando diferentes volumes de adenovírus aplicados em tumores de tamanhos variados desenvolvidos no subcutâneo de camundongos *nude*. Os autores observaram que não houve relação direta do tamanho tumoral com volume, ou seja, tumores com tamanhos de 100mm³ apresentaram melhor distribuição viral quando foram administrados com volumes reduzidos de vírus. A melhor eficiência de transdução foi correlacionada com doses menores de vírus em administradas em uma única injeção (10^9 - 10^{10} CFU/tumor). A quantidade de vírus detectada no fígado (avaliação da toxicidade) foi verificada apenas após múltiplas doses virais, por exemplo: 4x de 50 µl. Apesar de não termos avaliado a toxicidade da administração viral através da detecção de partículas virais no fígado, acreditamos que como utilizamos uma dose simples e de baixo volume, 50 µl, ainda estamos fora da carga viral com possível toxicidade.

Poucos trabalhos relatam a utilização das células H358 e genes supressores de tumor em camundongos *nude*. Um dos primeiros compara o efeito de p53 nas versões mutante e selvagem no estudo da inibição da proliferação tumoral. Em um modelo *ex vivo*, os autores observaram supressão após administração das células H358 transfectadas com p53 em animais SCID (Takahashi *et al.*, 1992). Eymin *et al.*, 2003, demonstraram em ensaios *ex vivo*, que após as células H358 transfectadas

estavelmente com p14^{ARF} serem implantadas nos camundongos *nude*, houve regressão de tumores.

Os resultados de nossos experimentos *in vivo* suportam as observações *in vitro*. A combinação bicistrônica p16IRESp53 apresentou melhor atividade anti-tumoral. Estes resultados indicam que a remediação simultânea de p16 e p53 mediada pelo adenovírus bicistrônico reduz drasticamente o crescimento tumoral e impõe uma desaceleração na velocidade de crescimento tumoral. Essa tendência de estabilização é mantida durante o período de 28 dias, quando o grupo de animais tratados com Adp16IRESp53 possui tumores 78,7% menores do que os tumores de H358 desenvolvidos no grupo de animais tratados com o vírus AdLacZ.

Os volumes relativos dos tumores foram acompanhamentos durante 30 dias após administração viral, e estes valores foram utilizados para construção de curvas de cinética de crescimento dos tumores de H358. Na primeira semana após a administração dos vírus, as curvas de crescimento dos tumores de H358 refletiram uma tendência para redução na velocidade de crescimento dos tumores que receberam os vírus Adp16IRESp53, em relação à curva dos tumores controles tratados com vírus AdLacZ, sem gene supressor de tumor.

Preparados histopatológicos corados com HE e TUNEL mostraram extensa região com células mortas, células alargadas e ausência de figuras de mitose nos tumores tratados com Adp16IRESp53. No final do período de acompanhamento, verificamos volumes semelhantes para os tumores dos grupos tratados com Adp16 e Adp53.

A análise da cinética de crescimento dos tumores de H358 tratados com o nosso conjunto de vírus supressores e tumor mostra que apesar da remediação simultânea de p16 e p53 mediada pelo arranjo bicistrônico ser mais eficiente do que a remediação de um único supressor p16 ou p53, não foi capaz de curar os animais, mas criou uma janela terapêutica, que pode ser explorada, por exemplo, com administração de quimioterápicos. A associação entre os tratamentos de intervenção gênica e quimioterapia consiste hoje em uma das principais alternativas terapêuticas contra o câncer. Trabalhos experimentais na linhagem H358 utilizando um adenovírus contendo p53 e o promotor Egr-1 (*Early Growth Response-1*) em conjunto com a droga cisplatina demonstraram estabilidade tumoral após o tratamento no subcutâneo de camundongos *nude*. (Wang *et al.*, 2005).

Os resultados de extensa análise comparativa entre os vírus supressores de tumor Adp16, Adp53 e Adp16IRESp53 *in vitro* e *in vivo* descritos aqui suportam a validação da hipótese de que o tratamento com múltiplos genes supresores de tumor é mais eficiente no ataque ao câncer. Finalmente, o conjunto desses resultados suporta o vetor Adp16IRESp53 como futuro candidato terapêutico no tratamento do câncer pulmonar.

7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Na última década inúmeros esforços têm sido direcionados para análise da assinatura do genoma da célula tumoral. Destes esforços resultaram centenas de genes que agrupados formam grosseiramente duas categorias: a dos candidatos a genes classificadores e a dos candidatos a genes anticâncer ou terapêuticos. Entre os classificadores estão aqueles que podem ser associados com características úteis para o diagnóstico do tumor, cálculo de risco e padrão preventivo. No grupo dos genes com potencial anticâncer ou terapêutico estão os principais alvos das pesquisas que buscam a aplicação da genômica no tratamento do câncer.

Proliferação celular descontrolada e exagerada é uma característica universal a todos os tipos de tumores. Praticamente, todos os cânceres humanos contêm mutações em genes das vias p53 (p53-p21^{WAF1}-p14^{ARF}-MDM2) e pRb (Rb-E2F-p16^{INK4a}) de controle da proliferação celular indicando que a perda funcional de ambas as vias é um evento comum no desenvolvimento tumoral. Distintas, mas interligadas, as vias p53 e pRb regulam processos chaves e muitas vezes com efeitos opostos, como proliferação (divisão mitótica) *versus* envelhecimento (senescência) *versus* morte celular (apoptose, necrose, catástrofe mitótica). Do ponto de vista de tratamento do câncer, o fato de que defeitos nas células tumorais estão constantemente concentrados em genes das vias p53 e pRb tem implicações práticas e teóricas, por exemplo apontam para a existência de importantes alvos terapêuticos dentro das vias p53 e pRb e de que esses alvos podem atuar eficientemente contra uma ampla variedade de cânceres.

Terapia gênica do câncer utiliza diversas estratégias, com muitos alvos e rotas diferentes, todavia a meta final é uma só: destruir ou parar o crescimento do câncer. Inibir a proliferação de células tumorais é um componente central para o tratamento do câncer e diversos pesquisadores utilizam a remediação de genes das vias p53 e Rb como estratégia contra proliferação de células tumorais.

O gene p53 está inativo em 50% dos tumores humanos e a maioria dos tratamentos anticâncer convencionais, incluindo radioterapia e quimioterapia, são mais efetivos em tumores com p53 normal. Protocolos de terapia gênica que utilizam a remediação da expressão de p53 estão entre os mais promissores e continuam ganhando eficácia e conseqüentemente interesse, apesar dos consideráveis

desafios. Dados estatísticos fornecidos pelo *Journal of Gene Medicine* em de 2007, mostram que entre os 854 protocolos clínicos experimentais de terapia gênica do câncer, 156 utilizam genes supressores de tumor, e 64 (41%) destes protocolos clínicos experimentais administram o gene p53 com fins terapêuticos. Vinte tipos diferentes de cânceres, incluindo pulmão, estão sendo tratados com adenovírus portador do gene supressor de tumor p53. Até o momento, existe apenas um protocolo clínico utilizando Adp16 para o tratamento de carcinoma de pâncreas. (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>).

Utilização do gene supressor de tumor p53 com fins terapêuticos é uma realidade. Atualmente, no *The Journal of Gene Medicine* (www.wiley.co.uk/genmed) estão catalogados 14 protocolos clínicos experimentais de terapia gênica para câncer de pulmão, incluindo o tratamento com adenovírus carreado p53 em associação com drogas quimioterápicas. Swisher *et al.*, 1999, relataram um dos primeiros resultados de protocolos clínicos experimentais de fase I envolvendo o tratamento de pacientes com carcinoma pulmonar com adenovírus p53, neste protocolo dos 28 casos tratados, 16 apresentaram um período de melhora com estabilização do tumor. Os benefícios clínicos de protocolos experimentais que combinam remediação de p53 em conjunto com quimioterapia estão começando a ser reportados. Fujiwara *et al.*, em 2006 relataram a eficácia da estratégia da utilização de múltiplas rotas de injeção intratumoral com Ad5CMVp53 sozinho ou em conjunto com administração intravenosa de cisplatina quando aplicados em pacientes com avançado câncer de células não-pequenas de pulmão, dez dos quinze pacientes tratados responderam com a estabilização da doença.

O tratamento de tumores humanos geralmente envolve a associação de duas ou mais estratégias terapêuticas, por exemplo, cirurgia e quimioterapia, cirurgia e radioterapia. Até a aplicação de quimioterápicos utiliza um coquetel com diversas drogas. Esta estratégia também pode ser aplicada nos ensaios experimentais de terapia gênica do câncer e utilizar dois ou mais genes terapêuticos, mas aqui o principal desafio está na construção dos veículos de transferência gênica. Adenovírus policistrônicos estão melhores adaptados para aplicação em ensaios de intervenção gênica onde é necessária a transferência simultânea de múltiplos genes. Até o momento, este tipo de vetor ainda não foi utilizado em protocolos clínicos experimentais.

Considerando que p16 é o principal alvo mutacional da via pRb, e que p16 e p53 atuam em diferentes mas, interligados mecanismos de controle do ciclo celular, foi lógico investigar o efeito da reposição combinada e simultânea de p53 e p16 nas células tumorais. Reparação simultânea de múltiplos supressores de diferentes vias de controle pode ter efeito supressor potencializado.

Os resultados deste projeto suportam a proposta de que a cooperação entre os genes p53 e p16 é uma poderosa e eficiente estratégia contra proliferação de células tumorais, como as células H358 derivadas de carcinoma de pulmão. E ainda que a transferência dos genes p16 e p53 mediada pelo arranjo bicistrônico é mais eficiente na supressão do ciclo celular do que a transferência mediada por dois vetores virais Adp16 + Adp53. Estes dados sugerem a importância de vetores de transferência gênica especialmente desenhados para atuar em situações onde varias vias ou vários genes devem ser reparados.

Os resultados dos ensaios *in vivo*, com o modelo xenográfico mostraram claramente a desaceleração do crescimento dos tumores após administração de Adp16IRESp53. Este efeito merece ser mais bem investigado, porque indica uma janela terapêutica, ou seja, a abertura para novas estratégias como administração de outra dose de vírus terapêutico ou associação com quimioterápicos. Sempre, o retardo no crescimento dos tumores implica em aumento da sobrevida dos pacientes e este fato não pode ser ignorado.

Câncer é uma das doenças que mais matam no mundo e tumores pulmonares estão entre os 3 principais tipos de câncer que mais matam no Brasil. Este projeto envolve todas as fases de ensaios pré-clínicos de terapia gênica, ou seja, construção de vetor viral original, produção das partículas virais, caracterização das preparações virais, testes funcionais *in vitro* e validação em modelo animal. A realização deste projeto tem como marca a produção de ferramentas biológicas que podem ser transformados em produtos biotecnológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS^{*}

Adachi Y, Chandrasekar N, Kin Y, Lakka SS, Mohanam S, Yanamandra N, *et al.*. Suppression of glioma invasion and growth by adenovirus-mediated delivery of a bicistronic construct containing antisense uPAR and sense p16 gene sequences. *Oncogene*. 2002;21:87-95.

Al-Hendy A Lee, EJ, Wang, HQ, Copland, JA. Gene therapy of uterine leiomyomas: adenovirus-mediated expression of dominant negative estrogen receptor inhibits tumor growth in nude mice. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;191(5):1621-1631.

Bartkova J, Lukas J, Guldberg P, Alsner J, Kirkin AF, Zeuthen J, Bartek J. The p16-cyclin D/Cdk4-pRb pathway as a functional unit frequently altered in melanoma pathogenesis. *Cancer Res*. 1996;56:5475–5483.

Bazan-Peregrino M, Carlisle RC, Purdie L, Seymour LW. Factors influencing retention of adenovirus within tumours following direct intratumoural injection. *Gene Ther*. 2008;15:688-694.

Bennett EM, Bennink JR, Yewdell JW, Brodsky FM. Cutting edge: adenovirus E19 has two mechanisms for affecting class I MHC expression. *J Immunol*. 1999;162:5049-5052.

Bergelson JM, Modlin, JF, Wieland-Alter, W, Cunningham, JA, Crowell, RL, Finberg, RW. Clinical coxsackievirus B isolates differ from laboratory strains in their interaction with two cell surface receptors. *J Infect Dis*. 1977;175:697-700.

Benitez JA, Arregui, L, Vergara, P, Segovia, J. Targeted-simultaneous expression of Gas1 and p53 using a bicistronic adenoviral vector in gliomas. *Cancer Gene Therapy*. 2007;14: 836-846.

Bischoff JR, Kirn DH, Williams A, Heise C, Horn S, Muna M, Ng L *et al.*. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science*. 1996; 274:373-376.

* De acordo com:

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

Borman AM, Le Mercier, P, Girard, M, Kean, KM. Comparison of picornaviral IRES-driven internal initiation of translation in cultured cells of different origins. *Nucleic Acids Res.* 1997;25:925-32.

Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW, Greenberg ME. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science.* 2004;303:2011-2015.

Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000;25:169-93. Review.

Byeon IJ, Li J, Ericson K, Selby TL, Tevelev A, Kim HJ *et al.*. Tumor Suppressor p16INK4A: Determination of Solution Structure and Analyses of its Interaction with Cyclin-Dependent Kinase 4. *Mol Cell.* 1998;1:421-431.

Campisi J. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends in Cell Biology.* 2001;11:S27-31.

Campisi J, di Fagagna d'Adda. Cellular senescence : When bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8:729-740.

Campos SK, Barry MA. Current advances and future challenges in Adenoviral vector biology and targeting. *Curr Gene Ther.* 2007;7:189-204. Review.

Cazzalini O, Perucca P, Savio M, Necchi D, Bianchi L, *et al.*. Interaction of p21(CDKN1A) with PCNA regulates the histone acetyltransferase activity of p300 in nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Res.* 2008;36:1713-1722.

Chiu, CP, Harley, CB. Replicative senescence and cell immortality: the role of telomeres and telomerase. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1997;214:99-106.

Chuan MKL, Collen, D, Vandendriessche, T. Biosafety of adenoviral vectors. *Current Gene Therapy.* 2003;3:527-543.

Costanzi-Strauss E, Strauss BE. Terapia Gênica do Câncer. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento.* 2002;28:26-28.

Costanzi-Strauss E, Strauss, BE, Naviaux, RK, Hass, M. Restoration of growth arrest by p16INK4, p21WAF1, pRB, and p53 is dependent on the integrity of the endogenous cell-cycle control pathways in human glioblastoma cell lines. *Exp Cell Res.* 1998;238:51-62.

Crichton D, Ryan KM. Splicing DNA-damage responses to tumour cell death. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1705:3-15. Review

Cross D, Burmester, JK. Gene Therapy for cancer treatment: past, present and future. *Clin Med Res.* 2006;4:218-227. Review.

Davies MV, Kaufman, RJ. The sequence context of the initiation codon in the encephalomyocarditis virus leader modulates efficiency of internal translation initiation. *J Virol.* 1992;66:1924-1932.

Debyser Z. A short course on virology/vectorology/gene therapy. *Curr Gene Ther.* 2003;3:495-499.

Deng WG, Kawashima H, Wu G, Jayachandran G, Xu K, Minna JD, Roth JA, Ji L. Synergistic tumor suppression by coexpression of FUS1 and p53 is associated with down-regulation of murine double minute-2 and activation of the apoptotic protease-activating factor 1-dependent apoptotic pathway in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res.* 2007;67:709-711.

Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92:9363-9367.

Dussault AA, Pouliot M. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. *Biol Proced Online.* 2006;8:1-10.

Elledge SJ, Harper, JW. Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Curr Opin Cell Biol.* 1994;6:847-852.

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

Eymin B, Leduc C, Coll JL, Brambilla E, Gazzeri S. p14ARF induces G2 arrest and apoptosis independently of p53 leading to regression of tumours established in nude mice. *Oncogene.* 2003;22:1822-35.

Evdokiou A.; Cowled P.A. Tumor-suppressive activity of the growth arrest-specific gene GAS1 in human tumor cell lines. *Int J Cancer*. 1998;75:568-577.

Finlay CA, Hinds, PW, Levine, AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell*.1989;57:1083-1093.

Frebourg T, Sadelain M, NG YS, Kassel J, Friend, SH. Equal transcription of wild-type and mutant p53 using bicistronic vectors results in the wild-type phenotype. *Cancer Res*. 1994;54:878-881.

Fujiwara T, Tanaka N, Kanazawa S, Ohtani S, Saijo Y, Nukiwa T, et al. Multicenter Phase I Study of Repeated Intratumoral Delivery of Adenoviral *p53* in Patients With Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24:1689-1699.

Fuster JJ, Sans-Gonzales SM, Moll UM, Andres, V. Classic and novel roles of p53: prospects for anticancer therapy. *Trends in Molecular Medicine*. 2007;5:192-199.

Gall J, Kass-Eisler A, Leinwand L, Falck-Pedersen E. Adenovirus type 5 and 7 capsid chimera: fiber replacement alters receptor tropism without affecting primary immune neutralization epitopes. *J Virol*. 1996;70:2116-2123.

Graham FL, Smiley J, Russel WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Genet Virol*. 1977;36:59-74.

Greenblat MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*. 1994;54:4855-4878.

Hall M, Peters G. Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Adv Cancer Res*. 1996;68:67-108.

Han J, Sabbatini P, Perez D, Rao L, Modha D, White E. The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein. *Genes Dev*. 1996;10:461-477.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer.*Cell*. 2000;100:57-70.

Harris SL, Levine AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*. 2005; 24:2899-2908.

Hearing P, Samulski RJ, Wishart WL, Shenk T. Identification of a repeated sequence element required for efficient encapsidation of the adenovirus type 5 chromosome. *J Virol*. 1987; 61:2555-2558.

Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sørlie T, *et al.*. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res*. 1994;17:3551-3555.

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

Horowitz JM, Park SH, Bogenmann E, Cheng JC, Yandell DW, Kaye FJ, Minna JD, Dryja TP, Weinberg RA. Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87:2775-2779.

Huang Y, Tyler T, Saadatmandi N, Lee C, Borgstrom P, Gjerset RA. Enhanced tumor suppression by a p14ARF/p53 bicistronic adenovirus through increased p53 protein translation and stability. *Cancer Res*. 2003;63:3646-3653.

Hunter, T, Pines, J. Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell*. 1994;79:573-582.

Hutchins B, Sajjadi N, Seaver S, Shepherd A, Bauer SR, Simek S, *et al.* Working toward an adenoviral vector testing standard. *Mol Ther*. 2000; 2: 532-534

Ihde DC, Minna, JD. Non-small cell lung cancer. Part II: Treatment. *Curr Probl Cancer*. 1991;15:105-154.

Jang SK, Wimmer E. Cap-independent translation of encephalomyocarditis virus RNA: structural elements of the internal ribosomal entry site and involvement of a cellular 57-kD RNA-binding protein. *Genes Dev*. 1990; 4:1560-1572.

Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*. 2002;108:153-164.

Kaelin WG. Choosing anticancer drug targets in the postgenomic era. *J Clin Invest.* 1999; 104: 1503-1506.

Kanerva A, Hemmink A. Modified adenoviruses for cancer gene therapy. *Int J Cancer.* 2004;110: 475-480.

Katsuda K, Kataoka M, Uno F, Murakami T, Kondo T, Roth JA et al. Activation of caspase-3 and cleavage of Rb are associated with p16-mediated apoptosis in human non-small cell lung cancer cells. *Oncogene.* 2002; 21:2108-2113.

Katayama K, Nakamura A, Sugimoto Y, Tsuruo T and Fujita N. FoxO transcription factor-dependent p15INK4b and p19INK4d expression. *Oncogene.* 2008;27:1677-1686.

Kelley MJ, Johnson, BE. Molecular biology of lung cancer. In: Mendelsohn J. The molecular basis of cancer. New York: Plenum Press; 2001. p. 260-287.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AH. Apoptosis, a basic biological phenomenon with wider implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 1972;26:239-245.

Kohno T, Yokota J. How many tumor suppressor genes are involved in human lung carcinogenesis? *Carcinogenesis.* 1999;20:1403-1410.

Kowalczyk DW, Wysocki PJ, Mackiewicz, A. Cancer immunotherapy using cells modified with cytokine genes. *Acta Biochim Pol.* 2003; 50:613-624.

Kozarsky KF, Wilson JM. Gene therapy: adenovirus vectors. *Curr Opin Genet Dev.* 1993;3:499-503.

Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P. Classification of cell death: Recommendations of the nomenclature committee on cell death. *Cell Death Differ.* 2005;12:1463-1467.

Krtolica A, Campisi J. Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2002; 34:1401-1414.

Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez PY, Campisi J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98: 12072-12077.

Landy A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu Rev Biochem.* 1989; 58: 913-949.

Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature.* 1992; 358:15-26

Lane DP, Crawford LV. *Nature.* 1979;278:261-263.

Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature.* 1991;651 453-456.

Levine AJ, W, Hu, Z. Feng. The p53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death and Differentiation.* 2006;13:1027-1036.

Léo P, Strauss BE, Muschellack L, Costanzi Strauss E. Construction, production and characterization of pCLp16IRESp53 polycistronic retrovirus for combined cancer gene therapy. *Virus Rev Res.* 2003; 8:219, 2003.

Li F, Brattain MG. Role of the Survivin gene in pathophysiology. *Am J Pathol.* 2006; 169:1-11. Review.

Li WW, Cordon-Cardo, C.; Chen Q.; Jhanwar S.C.; Bertino J.R. Establishment, characterization and drug sensitivity of four new human soft tissue sarcoma cell lines. *Int J Cancer.* 1996; 68: 514-519.

Ling YH, Liebes L, Jiang JD, Holland JF, Elliott PJ, Adams J, Muggia FM, Perez-Soler, R. Mechanisms of proteasome inhibitor PS-341-induced G(2)-M-phase arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res.* 2003, 9: 1145-1154.

Lisa FL. Deciphering the apoptotic pathway: All roads lead to death. *Immunology and Cell Biology.* 1998; 76: 1-19. Review.

Linzer DI, Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell.* 1979;17:43-52.

Lockshin RA, Williams CM. Programmed cell death. II: Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmths. *J. Insect Physiol.* 1964;10: 643.

Loughran O, Malliri A, Owens D, Gallimore PH, Stanley MA, Ozanne B, *et al.*. Association of CDKN2A/p16INK4A with human head and neck keratinocyte replicative senescence: relationship of dysfunction to immortality and neoplasia. *Oncogene.* 1996;13:561-568.

Lukas J, Parry D, Aagaard L, Mann DJ, Bartkova J, Strauss M, Peters G, Bartek J. Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature* 1995; 375:503–506.

Lusky M, Christ M, Rittner K, Diertele A, Dreyer D, Mouroto B, Schultz H, Stoeckel F, Pavirani A, Mehtali M. *In vitro* and *in vivo* biology of recombinant adenovirus vector with E1, E1/E2A, or E1/E4 deleted. *J Virol.* 1998; 72: 2022-2032.

Matthews DA, Russel WC. Adenovirus core protein V interacts with p32--a protein which is associated with both the mitochondria and the nucleus. *J Gen Virol.* 1998; 79: 1677-1685.

Maxwell S.A. Retinoblastoma protein in non-small cell lung carcinoma, cells arrested for growth by retinoic acid. *Anticancer Res.* 1994; 14: 1535-1540.

Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6: 449-58. Review

Mentel R, Dopping G, Wegner U, Seidel W, Liebermann H, Dohner L. Adenovirus-receptor interaction with human lymphocytes. *Journal of Medical Virology.* 1997; 51: 252-257.

Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nature Medicine.* 1995; 7: 686-692.

Modesitt SC, Ramirez P, Zu Z, Bodurka-Bervers D, Gershenson D, Wolf JK *In vitro* and *in vivo* adenovirus-mediated p53 and p16 tumor suppressor therapy in ovarian cancer. *Clinical Cancer Research.* 2001;7:1765-1772.

Momand J, Jung D, Wilczynski S, Niland J. The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res.* 1998; 26: 3453-3459.

Moorhead JW, Clayton GH, Smith RL, Schaack J. A replication-incompetent adenovirus vector with the preterminal protein gene deleted efficiently transduces mouse ears. *J Virol*, 1999; 73: 1046-1053.

Muschellack L, Léo P, Bajgelman, MC, Strauss BE, Costanzi Strauss E. Transfer of two strong cell proliferation inhibitors: CDKIs p16INK4a e p21WAF1. *Virus Rev Res.* 2003; 220.

Naviaux RK, Costanzi E, Hass M, Verma IMJ. The pCL system, rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. *Virology.* 1996; 70: 5701-5705.

Nemunaitis J, Ganly I, Khuri F, Arseneau J, Kuhn J, McCarty T, *et al.*. Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: a phase II trial. *Cancer Res.* 2000; 60: 6359-6366.

Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, *et al.* Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature.* 1989;342:705-708.

Nilsson K, Landberg G. Subcellular localization, modification and protein complex formation of the cdk-inhibitor p16 in Rb-functional and Rb-inactivated tumor cells. *Int J Cancer.* 2006;118:1120-1125.

Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Tajabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature.* 1994;368: 753-756.

Nyberg-Hoffman C, Shabram P, Li W, Giroux D, Aguilar-Cordova E. Sensitivity and reproducibility in adenoviral infection titer determination. *Nature Medicine.* 1997;7: 808-811.

Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1602:73-87.

Parant J, Chaves-Reyes A, Little NA, Yan W, Reinke V, Jochemsen AG, Lozano J. Rescue of embryonic lethality in Mdm4-null mice by loss of Trp53 suggests a nonoverlapping pathway with MDM2 to regulate p53. *Nat Genet.* 2001; 29: 92-95.

Pardee AB. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1974; 71: 1286-1290.

Park M, Hoil Kang, Sinae Lim, Choon-Taek Lee, Okhee Kim. Differential protein expressions induced by adenovirus-mediated p16 gene transfer into Balb/c nude mice. *Proteomics.* 2003; 3: 2412-2419.

Pearson SA, Spitz RF, Swisher SG, Kataoka M, Sarkiss MG, Meyn RE *et al.* Up-Regulation of the Proapoptotic Mediators Bax and Bak after Adenovirus-mediated p53 Gene Transfer in Lung Cancer Cells. *Clin Can Res.* 2000;6:887-890.

Rajaraman R, Guernsey DL, Rajaraman MM, Rajaraman SR. Stem cells, senescence, neosis and self-renewal in cancer. *Cancer Cell International.* 2006;8:6-25.

Randle DH, Zind F, Sherr CJ, Roussel MF. Differential effects of p19(Arf) and p16(Ink4a) loss on senescence of murine bone marrow-derived preB cells and macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:9654-9659.

Remington JS. Fluorescent proteins: maturation, photochemistry and photophysics. *Current Opinon in Structural Biology.* 2006;16:714-721.

Richet E, Abcarian P, Nash HA. The interaction of recombination proteins with supercoiled DNA: defining the role of supercoiling in lambda integrative recombination. *Cell.* 1986;46:1011-1021.

Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward, TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1953;84:570-3.

Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.* 2000;132:365-86.

Ruas M, Peters, G. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1378:115-177.

Rui Hong-Bing, Su Jin-Zi. Co-transfection of p16INK4a e p53 genes into the K562 cell line inhibits cell proliferation. *Mol Hematology*. 2002;87:136-142.

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

Sambrook J Fristch EF, Maniats T. *Molecular clonig: a laboratory manual*. New York Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

Sandig V, Brand K, Herwig S, Lukas J, Bartek J, Strauss M. Adenovirally transferred p16INK4/CDKN2 and p53 genes cooperate to induce apoptotic tumor cell death. *Nature Medicine*. 1997; 3: 313-319.

Serrano M, Hannon G, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclinD/CDK4. *Nature*. 1993; 366: 704-707.

Serrano M. The INK4a/ARF locus in murine tumorigenesis. *Carcinogenesis*. 2000; 21: 865-869.

Shabram P, Aguilar-Cordova E. Multiplicity of infection/multiplicity of confusion. *Mol Ther*. 2000; 2:420-421.

Sharpless NE, Alson S, Chan S, Silver DP, Castrillon DH, De Pinho RA. p16(INK4a) and p53 deficiency cooperate in tumorigenesis. *Cancer Res*. 2002; 62: 2761-2765.

Shenk, T. *Adenoviridae: The viruses and their replication*. In: *Fields Virology*; 2001, p. 2265-2300.

Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Gene Development*. 1999;13:1501-1512.

Sherr CJ, Roberts, JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Development*, 1995;9:1149-1163.

Sherr CJ. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Research*. 2000; 60: 3689-3695.

Sherr CJ. Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. *Genes Dev*. 1998; 12: 2984-2991.

Soussi T. p53 alterations in human cancer: more questions than answers. *Oncogene*. 2007; 26: 2145-2156. Review

Stauber RH, Mann W, Knauer SK. Nuclear and cytoplasmic survivin: molecular mechanism, prognostic, and therapeutic potential. *Cancer Res*. 2007 ;67:5999-6002. Review.

Stevenson SC, Rollence M, White B, Weaver L, McClelland A. Human adenovirus serotypes 3 and 5 bind to two different cellular receptors via the fiber head domain. *J Virol*. 1995; 69:2850-2857.

Stewart PL, Chiu CY, Huang S, Muir T, Zhao Y, Chait B, Mathias P, Nemerow GR. Cryo-EM visualization of an exposed RGD epitope on adenovirus that escapes antibody neutralization. *EMBO Journal*. 1997; 16: 1189-1198.

Stone D, Lieber A. New sorotypes of adenoviral vectors. *Curr Opin Mol Ther*. 2006; 8: 423-431.

Strauss BE, Costanzi-Strauss E: Combating oncogene activation associated with retrovirus-mediated gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency. *Braz Journal of Med and Biol Res*. 2007; 40: 601-613.

Strauss BE, Costanzi E. pCLPG: a p53-driven retroviral system. *Virology*. 2004;321: 165-172.

Strauss BE, Fontes RB Lotfi CF, Skorupa A, Bartol I, Cipolla-Neto J, Costanzi-Strauss, E. Retroviral transfer of the p16INK4a cDNA inhibits C6 glioma formation in Wistar rats. *Cancer Cell Inter*. 2002;2: 1 - 9.

Strauss BE, Patrício JR, de Carvalho AC, Bajgelman MC. A lentiviral vector with expression controlled by E2F-1: a potential tool for the study and treatment of proliferative diseases. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 348:1411-1418.

Swisher SG, Roth JA, Nemunaitis J, Lawrence DD, Kemp BL, Carrasco CH. Adenovirus-mediated p53 gene transfer in advanced non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1999; 91:763-771.

Takahashi T, Carbone D, Takahashi T, Nau MM, Hida T, Linnoila I, Ueda R, Minna JD. Wild-type but not mutant p53 suppresses the growth of human lung cancer cells bearing multiple genetic lesions. *Cancer Res*. 1992;52:2340-2343.

Taylor WR, Stark JR. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*. 2001;20:1803-1815.

Tolozza EM, Roth JA, Swisher SG. Molecular events in bronchogenic carcinoma and their implications for therapy. *Semin Surg Oncol*. 2000;18:91-99.

Tomayko MM, Reynolds CP. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother. Pharmacol*. 1989; 24:148-154.

Van der Horst A, Burgering BM. Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8: 440-450. Review

Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, Tuveson DA, Grimm J, Lintault L, *et al.*. Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature*. 2007;445: 661-665.

Verma IM, Weitzman MD. Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem*. 2005;74:711-38. Review.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000;408:307-310.

Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8: 275-283. Review.

Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*. 1994;369:574-578.

Wang WD, Li R, Chen ZT, Li DZ, Duan YZ, Cao ZH. Cisplatin-controlled p53 gene therapy for human non-small cell lung cancer xenografts in athymic nude mice via the CArG elements. *Cancer Sci*. 2005;96:706-712

Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. 1995; 81:323-330.

White E, Cipriani R, Sabbatini P, Denton, A. Adenovirus E1B 19-kilodalton protein overcomes the cytotoxicity of E1A proteins. *Journal of Virology*. 1991; 65: 2968-2678.

Whitfield ML, George LK, Grant GD, Perou CM. Common markers of proliferation. *Nature*. 2006;6:99-106.

Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*. 1993;366:701-704.

Yokota J, Kohno, T. Molecular footprints of human lung cancer progression. *Cancer Science*. 2004;95:197-204.

Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 9:47-59.

Zindy F, Quelle DE, Roussel MF, Sherr CJ. Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene*. 1997;15:203-211.

ANEXOS

ANEXO 1 Sequências derivadas do ensaio de sequenciamento realizado nos plasmídeos adenovirais pAdeGFP, pAdp16, pAdp53 e pAdp16IRESp53

pAdeGFP

V5

AGCTACTTCAACGCGGGCANNCTANATCAACACTTTGTACAAGAACTGGGTCTAGATAT
CTCGAGTGCGGCCGCGAATTCGGTACCGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCTTTAC
TTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGATCCCGGCGGCGGTACGAACTCCAGCAGGA
CCATGTGATCGCGCTTCTCGTTGGGGTCTTTGCTCAGGGCGGACTGGGTGCTCAGGTA
GTGGTTGTCGGGCAGCAGCACGGGGCCGTCGCCGATGGGGGTGTTCTGCTGGTAGTG
GTCGGCGAGCTGCACGCTGCCGTCCTCGATGTTGTGGCGGATCTTGAAGTTCACCTTG
ATGCCGTTCTTCTGCTTGTGCGCCATGATATAAACGTTGTGGCTGTTGTAGTTGACTCC
AGCTTGTGCCCCAAGATGTTGCCGTCCTCCTTGAAGTCGATGCCCTTCAGCTCGATGCG
GTTACACAGGGTGTCGCCCTCGAACTTCACCTCGGCGCGGGTCTTGTANTTGCCGTCN
TCCTTGAANAAAANGGTGCGCTNCTGGACGTAANCTTCCGGCATGGCGGACTGAANAA
ATCTGCTGCTTCATGTGGTCCGGGTACCGCTGAAACANTGCACNCNTNAGGTAAGGTG
GTCAACNAAGGTNNGGCCAGGGCACGGGCANCTTCCCGTGTTGGAAAANA

T7

TNTNNCAGTNNNGNTATNNTTNNNTTGNATTNNNTANATNNNTGCANCTNNNNNTNNNN
TATCTCTNNNCTNCNAGTGANACANTNNNTATGANTTATAGCAGNNCTCTGGTNNNTATC
TTNNTCNATCTNTGCTANCNNNTCTTTCTNTGTACNTNGCTNNNTCGAGANTNNNNGG
CNNACCANGCTTTCTANCGNAGCTTTCCCAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTGGCGCCG
GAACCAATTCAGTCGACTGGATCCACCGGTGCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
CTGTTACCGGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCAC
AAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTG
AAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCC
TGACCTACGGCGTGCAAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTT
CTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTAAGGA
CGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAATTTGAGGGCGACACCCCTGGTGA
ANCGCATCGAGCTGAANNGGCATCGGACTTCAAGGANGGACGGGCAACATTCCTGGG
GGCACANGCTTGGAGTACAACTNCCAACAGGCCCAACGNTCTTATATNANTGGGCCC
GNANAAAGCTANAAAAGAAACGGGGCAATTCNAAGGGGGGNAAANTTTNAAAGAATCC
CGCNCNACCCAACCCANTCCTANGGGAACGNGGCAGGCGGTTGGTAAGANTNTCGGN
CCCGAAACAACTANATCTAGGCAGGAAAACANCCNCCCTATTTGCGGCNNGAAACCG
NGGCCCCCCTANGGCTNTNCTTGNCCCCCGNACAAAACCCGANCTTAATCCCNTGG
GAGAGCNAACC

pAdp16**V5**

GTACNAGAAAGCTGGGTCTAGATATCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTTTTACATT
 TTTATAAGAATATATAAAAAATGATATAAATGGACATTTACGGTAGTGGGGGAAGGCATA
 TNTCTACNTTAAAAGGNAGGACATTTTTTAAAAGCTCTATTTTCTAAATGAAAACTACNAAA
 GCGGGGTGGGTGTGGCGGGGGCAGTTGTGGCCCTGTAGGACCTTCGGTGACTGATG
 ATCTAAGTTTNCGGAGGTTTCTCANAGCCTCTCTGGTTCTTCAATCGGGGATGTCTGAN
 GGACCTTCCGCGGCATCTATGCGGGCATGGTTACTGCCTCTGGTGCCCCCCNCAGCCG
 CGCGCAGGTACCGTGCGACATTCCGATGGCCCANCTCCTCNNCCAGGTCCACGGGGC
 AGACGGCCCCAGGCATTGNGCANNNTCNANCCGCGNCCCNGCCCGGTGTATCACCCNC
 AGCGTGTCCNNGAAACNCTNCCGGGCAGCGTCTTGACACAGGTTCCNNGTGAAAATGGCC
 GGGGTCNGCCCAATTTGGCTCANNCCCCNGGGGAANAANCAACNAANTTCNTCCACTC
 CGGGGGGCTGCCCCATNNATCAATGACCTTNGATTGCGCCTCCNGACCNTAAATTTATT
 TGGTCCCTTGGGGNAAANGNCCCCCNCCCTTTNAAC

T7

CCCCNTTCNGACCANNAGNCGNNNNNANTNNNNAANNNTNNACTNCTNNNNANANANNT
 TNACNTANNNNTATCNGGANCTNGNNNNNGNCATNATGNTNCTNGTNNTNNAANTGG
 NTTNCNNTCANNGTATAACCACTNTCNCGGNTNTNCNNACCNGNTCCNAAGGACTTTNC
 CAAGGTTGTACAAAAACAGGCTGGCGCCGGAACAATTCAGTCGACTGGATCCGGTAC
 CGAATTCGGCACGAGCTCGGCGGNTGCGGAGAGGGGGAGAGCAGGCAGCGGGCGGC
 GGAGAGCAGCATGGAGCCGGCGGCGGGGAGCAGCATGGAGCCTTCGGCTGACTGGC
 TGGCCACGGCCGCGGCCCGGGTCTGGGTAGAGGAGGTGCGGGCGCTGCTGGAGGCG
 GGGGCGCTGCCAACGCACCGAATAGTTACGGTCTGGAGGCCGATCCCAGGTCATGAT
 GATGGGCAGAGCCCGAGTGGCGGANNTGCTGCTGCTCCACGGNGCGGAGCCCAANTG
 CGNCGACCCCNCCACTCTTCANCCGACCCGTGCACGANNCTGCCCGGGAGGGNTTCC
 TGGANCGCTGGTGGTGTGCTGCACCNGGTCTGGGGCGCGGCTGGACNTGCGCGANGCCT
 GGGGCCGTCTGCCCCGTGGACCTGGGCTGAGGANNTGGGCCATCCCAGAGGTGCGCAG
 GGAAGTGGCTCNCGNGCNTGCGGGGGGCTACNACAAGCCANTTACCCTGNNCGCCAA
 ANANACCGACGGNAAGGGNCCCTTCAAACAATTCCCGGATTGGNNAAGAAACCAGCAN
 ANGGNTNCTNGAGAAAANCNTCCGGGAAANATTATATTATCATCAANTCCCCNGNAAGGC
 CCTTANCANGGGGCCANAAAATTGNNCCC

pAdp53**V5**

TTNCAAGGNGGGTTTCCAAANCAACACTTTGTACTAGAAAGCTGGGTCTAGATATCTCG
 AGTGCGGCCGCGAATTCGGTACCGGATCCAGATCATCATATACAAGAGATGAAATCCTC
 CAGGGTGTGGGATGGGGTGAGATTTCTTTTANGTACTAAGGTTACCAAGAGGTTGTC
 AGACAGGGTTTGGCTGGGCCAGCAGAGACTTGACAACTCCCTCTACCTAACCAGCTGC
 CCAACTGTAGAACTACCAACCCACCGACCAACAGGGAGAGGGAACAAGCACCCCTCAA
 GGGGGTCAAGTTCTAGACCCCATGTAATAAAAGGTGGTTTCAAGGCCAGATGTACATTA
 TTTCATTAACCCCTCACAATGCACTCTGTGAGGTAGGTGCAAATGCCAGCATTTACAGAT
 ATGGGCCTTGAAGTTAGAGAAAATTNAACAGTGAGGGACAGCTTCCCTGGTTAGTACGG
 TGAAGTGGGCCCTACTAAAATGTGGCTGATTNTNAACCTAACCTTACTGCAAGAACATT
 TCTTACATCTCCCAAACATCCCTCACAGTAAAAACCTTNAATCTAAGCTGGGNATGTTT
 TACTCCCATNCTCCTCCCCACAACAAAAANACCAATTGCAGGGCAACTTGTTTAGTGG
 AACCCCGGGACCAAANNAAGGAANTCCTGGGGGGTTNTTGAC

T7

CNCCCTCACTATCNNTCATAANATACGTATNAAGANATAGNNATTANNNNGNNANAATAN
 ACTCCTNNACTNNAGATGNGACGACTTCAGNNTANTGTNTNAGCTCANCNTNCNNANCT
 GCTCTCCANNTNTNNTGANGNACNGGANTANACANGANAGNNNNNNNCNACCAAGCT
 TTCCANGGAAGCTTTNCCAAGNTTGTAACAAAAAGNNGGGCTGGCGCCGGGAACCAAT
 TCAGTCGACTGGATCCGGTGGTGGTGCAAATCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGC
 CTTTACTTCTAGGCCTGTACGGAAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCTGCAGGGGGG
 GGGGGGGGGGCAATTTNNCNACTANCNTANNTCNCCNTANTANTCTTCNGCANACAN
 CNATTACGCTCCCNCTGNACAAGANCTNTNGCNGNCTCAACNNNTNGTCGANTGNAT
 NNACNTAANNANNTNNNNAATNCCNTNAANTNANGNCCCAATCCATACNCNTNCNNTN
 NNANTTNCCTAGNANNNNCTNNACAAATGNNNNNANCTGNATNNGANGCCCNCGNGNN
 NNCCGNTCCNCCTNNACGNATNNATTATAATACANANATNNCTNCNNNANCCAGANNC
 AGCNGACTNGTNTTTCNAACCGNCNAGNCANCGATNNCGANCNCNCGAAGATNATCA
 CNNCTATACCTGNTATNACCTCTANCTCANATCNANACCCATCNATCCNCGGANGTCTG
 ATCCTCAGATAGTCCGAGNAGGGTACACGGATNACGANANNTCTACGTGANNNGCANC
 NCTTNGCNNCTGTAANCCANTCACAATACTATGCTACGCGAGACNAGACTCNTACACTN
 AGTCGCNANNNNANANNATNNTNNTNCATCCNNNCANATTAGTANCGNNTCTCCGNG
 NNATNNCANNCGANNTAATGNGCTNGCAGANNNCAGTCNCTNCAGNATATCNNTATAAN
 NANNATANNTNATNANCGCTAGTCNGTCNNACTCNGGNNNCTCGANNNNCCTNACNCTT
 CNGCGAACAGANATNGTCAACAGGCNGTNTATACTNNNCTAGCTNTCATCTAAGATNTA
 NNAGAGAGNNNCAATCGTACTNNATAGCTANTNCANNACTACNCNCGCANAAANNTTNN
 NNCNTNNTCACTCCC

pAdp16lRESp53

V5

TCCNAAGNGGGTTTCCTNAACAACCACTTTGTACNAGAAAGCTGGGTCTAGATATCTCG
 AGATCCTAGACCCCATGTAATAAAAGGTGGTTTCAAGGCCAGATGTACATTATTTTCATTA
 ACCCTCACAATGCACTCTGTGAGGTAGGTGCAAATGCCAGCATTTACAGATATGGGCC
 TTGAAGTTAGAGAAAATTCAACAGTGAGGGACAGCTTCCCTGGTTAGTACGGTGAAGTG
 GGCCCTACCTAGAATGTGGCTGATTGTAACTAACCCTTAAGCTGCAAGAACATTTCTTA
 CATCTCCCAAACATCCCTCACAGTAAAAACCTTAAATCTAAGCTGGTATGTCCTACTCC
 CCATCCTCCTCCCCACAACAAAACACCAGTGACAGGCCAACTTGTTCAAGTGGAGCCCCG
 GGACAAAGCAAATGGAAGTCCTGGGTGCTTCTGACGCACACCTATTGCAAGCAAGGGT
 TCAAAGACCCAAAACCCAAAATGGCAGGGGAGGGAGAAATNNNNNNNNNNNTNNNNNNN
 ANNNNNNCNNNTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTNCNNTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTNNC
 NTTNNTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCNNTTNNNNNNNNNNNNNNNTNNNNNCNNNTTNNNTN
 NNTNNNNNNNNNTNNNNNNNNNTNNNTNNNNNNNNNNNNNNNNNTNNNNNNN
 NNTNTNNNNNTNNNCNNNNNNNNNNNNNNNTNNNNCN

T7

ANCAAGCTCNNTAGANCTTNNCAAGGGTGNACAAAAAATTTGCTCGNNCCGGAACCAAT
 TCAGTCGACTGGATCCGGTACCGAATTCNGCACGAGCTCGGCGGTTGCGGAGAGGGG
 GAGAGCAGGCAGCGGGCGGCGGAGAGCAGCATNGAGCCNGCGGCGGGGANNANCAT
 GGAGCCTTCGGCTGACTGGCTGGCCACGGCCGCGGCCCGGGGTCGGGTAGAGGAGG
 TGCGGGCGCTGCTGGAGGNTGNNGCGCTGNCTAANGCACCNNATAATTNCGGTNGGA
 GGNCTATCNAGGTCATGGATGATGGGTAACNTCCGAGAGNCGGAGCTNCTNNTNCTTC
 ANNGCGCGGAAGCCCAACTGCGCNGACTTNCNTCATTTACCCCNACNCGTTGNACAA
 CGCTTCCCGGNAGGGCTTTNCTGGACACGCTGGTGGTGCCTNCACCGGGCNTTGGGC
 GCGNTNGGACATNNACTATGCCTNGNGGNNCNTCTNCCNNTTGGACCTTGATTGAANN
 ACTTTGGNNCTTCGTNGTATNTTTNCTATGNNANCNTANGCAGCTNGCTTGTTNGGGGG
 GTACCCCANNAATGCNAGTTTAATCNTTCCANCAATTANATTTNCTNCGANNAGTTNC
 NATACATNAAATTTCTNNANAAATTNGAACNTNAAAATCTNNATGTNTGGNTCTTCNTATA
 NAANAACCCTTTTTTNGNNNAAANATTTAGNTNTNNCTTATATTCANNTNTNNTGNTCTCT
 TAANATANAGGNNCTTCCATACTTNGTTTCCTTCCCT