

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA  
E DO AMBIENTE

**EXPRESSÃO DA PROTEÍNA VP3 DO GIROVÍRUS AVIÁRIO 2 EM VETORES  
ADENOVIRAIS E AVALIAÇÃO DO EFEITO SOBRE A VIABILIDADE DE  
CÉLULAS HUMANAS TUMORAIS E NÃO TUMORAIS**

**MARCUS BRAGA KNAK**  
Bacharel em Biomedicina

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.  
Março de 2014.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA  
E DO AMBIENTE

**EXPRESSÃO DA PROTEÍNA VP3 DO GIROVÍRUS AVIÁRIO 2 EM VETORES  
ADENOVIRAIS E AVALIAÇÃO DO EFEITO SOBRE A VIABILIDADE DE  
CÉLULAS HUMANAS TUMORAIS E NÃO TUMORAIS**

**MARCUS BRAGA KNAK**

Bacharel em Biomedicina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente como um dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Março de 2014.

#### CIP - Catalogação na Publicação

Knak, Marcus Braga  
EXPRESSÃO DA PROTEÍNA VP3 DO GIROVÍRUS AVIÁRIO 2  
EM VETORES ADENOVIRAIS E AVALIAÇÃO DO EFEITO SOBRE  
A VIABILIDADE DE CÉLULAS HUMANAS TUMORAIS E NÃO  
TUMORAIS / Marcus Braga Knak. -- 2014.  
97 f.

Orientadora: Ana Cláudia Franco.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. girovírus aviário 2 (AGV2). 2. VP3. 3.  
apoptina. 4. apoptose. 5. câncer. I. Franco, Ana  
Cláudia, orient. II. Título.



## AGRADECIMENTOS

A minha família, em especial aos meus pais pelo imenso apoio, confiança e compreensão incondicionais em todos os momentos. Pelo esforço para manter meus estudos, pela minha educação e por todo amor que foi e é minha inspiração para a vida. E à vó Landa e vô Ivo pela constante ajuda, preocupação, interesse e por sempre confiarem em mim.

A minha namorada, Laura, meu porto seguro que esteve sempre ao meu lado e participou intensamente das mais diversas formas para que essa conquista fosse possível. Fosse ajudando a resolver as dificuldades do trabalho, fosse me dando forças para continuar ou me acalmando nos momentos mais complicados. Obrigado pelas infundáveis demonstrações de amor, mesmo quando nem merecia. Obrigado por me tornar uma pessoa melhor e mais feliz a cada dia. Sem ti não seria nem metade do que sou hoje. Muito obrigado por dividir tua vida comigo e me aguentar. Vencemos juntos mais essa batalha! Te amo!

A minha orientadora, Ana Cláudia, pelos ensinamentos, pelo empenho, pela confiança no meu trabalho e por sempre acreditar que tudo ia dar certo toda vez que esbarrávamos em um novo obstáculo.

A todos os colegas do laboratório de virologia pela colaboração, troca de ideias e convívio. Em especial aos integrantes da “panela das galinhas”, Fernanda, Josi e Jamile por tornar o ambiente muito mais agradável e divertido, pelos intermináveis cafés com alfajor e conversas *non-sense*, tornando possível rir mesmo quando tudo estava dando errado. Agradeço também a Thalita, a mãe de todas as células usadas nesse trabalho, e a Cris e a Lara pelo interesse nesse estudo e pela pronta disposição em abraçar esse trabalho para finalizá-lo.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Cláudio Wageck Canal, Prof. Adriano Brandelli e Fabrício Souza Campos, por aceitarem o convite para avaliar esse trabalho e pelas sugestões para a melhoria do mesmo.

À UFRGS por proporcionar ensino gratuito e de qualidade, e à CAPES pelos recursos financeiros para a realização desse trabalho.

A todos que não estão aqui mencionados, mas que de várias formas são parte desta conquista.

Muito obrigado!

# EXPRESSÃO DA PROTEÍNA VP3 DO GIROVÍRUS AVIÁRIO 2 EM VETORES ADENOVIRAIS E AVALIAÇÃO DO EFEITO SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HUMANAS TUMORAIS E NÃO TUMORAIS<sup>1</sup>

Autor: Marcus Braga Knak

Orientadora: Dra. Ana Cláudia Franco

## RESUMO

A VP3, ou Apoptina, é uma das proteínas codificadas pelo vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV). Esta proteína é capaz de induzir apoptose em células humanas tumorais; entretanto, o mesmo não ocorre em células normais. Assim, esta proteína apresenta-se como uma promissora candidata como agente antineoplásico. O girovírus aviário 2 (AGV2), descrito em 2011, é relacionado ao CAV e codifica proteínas homólogas às expressas por este vírus, incluindo a VP3. A comparação da sequência de aminoácidos da VP3 do AGV2 com a da Apoptina do CAV revela uma identidade de 32,2% e o compartilhamento de domínios importantes para a atividade pró-apoptótica tumor-específica. Nesse trabalho objetivamos investigar o potencial de três variantes da VP3 do AGV2 em induzir seletivamente a morte de células humanas tumorais. Os genes das VP3 foram expressos através de um sistema de expressão adenoviral. Após a transdução dos adenovírus recombinantes expressando as VP3 do AGV2 nas células humanas tumorais A549 e normais MRC-5, a localização subcelular dessas proteínas foi analisada por imunofluorescência e suas implicações sobre a viabilidade celular foram determinadas pelo ensaio de MTT. Nossos resultados evidenciam que os adenovírus expressando as variantes da VP3 do AGV2 possuem a habilidade de inibir preferencialmente a proliferação de células tumorais. Demonstramos também que as VP3 do AGV2 acumulam-se no núcleo das células tumorais, enquanto que na maior parte das células normais essas proteínas ficam restritas ao citoplasma. No entanto, inesperadamente detectamos, em menor proporção, a expressão de VP3 do AGV2 também no núcleo das células normais. Ainda, analisando as sequências de aminoácidos das variantes da VP3 do AGV2, pudemos conjecturar que a presença de um sinal de exportação nuclear com menor eficiência do que o existente na Apoptina do CAV pode estar correlacionado com a localização nuclear dessas proteínas nas células normais e com a inibição da proliferação celular verificada nessas células. Este é o primeiro trabalho demonstrando o potencial da proteína VP3 codificada pelo AGV2 em induzir preferencialmente a morte de células humanas tumorais.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Microbiologia do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (97 p.) Março, 2014.

# EXPRESSION OF AVIAN GYROVIRUS 2 VP3 PROTEIN IN ADENOVIRAL VECTORS AND EVALUATION OF THE EFFECT ON THE VIABILITY OF HUMAN TUMOR AND NON-TUMOR CELLS<sup>2</sup>

Author: Marcus Braga Knak

Supervisor: Ana Cláudia Franco

## ABSTRACT

VP3, also known as Apoptin, is one of the proteins encoded by the chicken anemia virus (CAV). This protein is able to induce apoptosis in tumor cells; however, the same does not occur in normal cells. Thus, this protein appears as a promising candidate for anticancer therapy. The recently discovered avian gyrovirus 2 (AGV2) is related to CAV and encodes CAV-homologous proteins, including VP3. The comparison of the AGV2-VP3 amino acid sequence with CAV-Apoptin shows an identity of 32.2% and the presence of functional domains that seem to be important for its tumor-specific pro-apoptotic activity. In this work, we aim to investigate the potential of three AGV2-VP3 protein variants as inducers of apoptosis in human tumor cells. VP3 genes were expressed through an adenoviral expression system. After transduction of the recombinant adenoviruses expressing the AGV2-VP3 variants in human tumor A549 cells and normal MRC-5 cells, subcellular localization of these proteins was analyzed by immunofluorescence and their effects on cell viability was determined by MTT assay. Our results show that the adenoviruses expressing AGV2-VP3 have the ability to inhibit preferentially the proliferation of tumor cells. We also demonstrate that AGV2-VP3 variants accumulate in the nucleus of tumor cells, whereas in most normal MRC-5 cells these proteins are restricted to cytoplasm. However, we unexpectedly detected the expression of AGV2-VP3 proteins, in a lesser extent, in the nucleus of normal cells. Furthermore, analyzing the amino acid sequences of AGV2-VP3 variants we could speculate that the presence of a nuclear export signal (NES) with a lower efficiency than CAV-Apoptin NES may be correlated to the nuclear localization of these proteins in normal cells and to the cell proliferation inhibition observed in these cells. This is the first study validating the potential of AGV2-VP3 protein to preferably induce death of human tumor cells.

---

<sup>2</sup> Master of Science dissertation in Environment Microbiology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (97 p.) March, 2014.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. Objetivo Geral .....	3
1.2. Objetivos Específicos .....	3
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>4</b>
2.1. Câncer.....	4
2.1.1. p53.....	9
2.1.2. Tratamentos.....	11
2.2. Apoptose .....	13
2.2.1. Morfologia da apoptose .....	15
2.2.2. As vias apoptóticas.....	16
2.3. Apoptina .....	21
2.3.1. Atividade pró-apoptótica tumor-seletiva da Apoptina.....	21
2.3.2. Estrutura .....	25
2.3.3. Localização subcelular diferencial da Apoptina .....	26
2.3.4. Indução da apoptose .....	29
2.4. Girovírus Aviário 2.....	33
2.5. Expressão de proteínas recombinantes .....	34
2.5.1. Sistemas de expressão.....	35
2.5.2. Sistemas de transferência gênica.....	37
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
3.1. Células e cultivo celular.....	40
3.2. Amplificação do gene da VP3 por PCR.....	40
3.3. Construção dos vetores de entrada .....	42
3.4. Análise das sequências de nucleotídeos e de aminoácidos .....	42
3.5. Construção dos vetores adenovirais recombinantes.....	43
3.6. Transfecção dos vetores adenovirais recombinantes .....	44
3.7. Amplificação do estoque viral.....	45
3.8. RT-PCR.....	45



3.9. Imunofluorescência .....	46
3.10. Teste de viabilidade celular .....	47
3.11. Análise Estatística .....	48
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>49</b>
4.1. Análise das sequências da VP3 dos variantes do AGV2 .....	49
4.2. Amplificação do gene da VP3 por PCR.....	52
4.3. Construção dos vetores adenovirais recombinantes.....	52
4.4. Geração dos adenovírus recombinantes.....	54
4.5. Confirmação da síntese de RNAs mensageiros das VP3 .....	55
4.6. Inibição da proliferação celular pelos Ad<VP3-T>, Ad<VP3-SM> e Ad<VP3N1>.....	56
4.7. Localização subcelular .....	59
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>69</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>70</b>
<b>8. VITA.....</b>	<b>81</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Progressão do câncer por estágios múltiplos. Sucessivas mutações capazes de oferecer alguma vantagem proliferativa acabam selecionando a população. (Adaptado de Strachan; Read, 2010). ..... 6
- Figura 2 – Características promotoras do desenvolvimento do câncer e habilidades adquiridas pelas células cancerosas. Hanahan e Weinberg (2011) sugerem que os cânceres adquirem o mesmo grupo habilidades durante seu desenvolvimento. (Adaptado de Hanahan; Weinberg, 2011). ..... 7
- Figura 3 – Mutações em proto-oncogenes e genes supressores de tumor podem levar à transformação celular. (A) Uma única mutação em um proto-oncogene com ganho de função pode gerar um oncogene e promover a transformação da célula. (B) Um gene supressor de tumor deve sofrer mutações com perda de função em ambas as cópias para que se promova a transformação celular. (Adaptado de Alberts et al., 2007). ..... 8
- Figura 4 – A p53 atua como um sensor de estresse celular. Em resposta a diversos estímulos lesivos esta proteína é ativada podendo desencadear diferentes desfechos à célula. (Adaptado de Alberts et al., 2007). ..... 10
- Figura 5 – Efeitos do desbalanço entre a proliferação e morte celular na homeostase. As taxas de proliferação e morte celular estão indicadas pela espessura das setas. Mantida a taxa de proliferação, alterações na taxa de morte celular podem levar ao acúmulo de células ou a perda celular, e conseqüentemente a desordens decorrentes destes desbalanços. (Adaptado de Thompson, 1995). ..... 14
- Figura 6 – Alterações morfológicas visualizadas durante a apoptose. (A) Encolhimento celular e picnose. (B) Fragmentação do núcleo e brotamento dos processos celulares. (C) Fragmentação em corpos apoptóticos. (Adaptado de Majno; Joris, 1995). ..... 15
- Figura 7 – Fotomicrografia de uma secção de pâncreas exócrino de camundongo. Células apoptóticas indicadas por setas, nas quais se visualizam o encolhimento celular, condensação citoplasmática, picnose e fragmentação nuclear. Nota-se também a ausência de processo inflamatório. Coloração Hematoxilina & Eosina. (Fonte: Elmore, 2007). ..... 16
- Figura 8 – Representação dos principais eventos que ocorrem durante as vias de iniciação da apoptose. Cada uma das vias necessita de sinais desencadeadores específicos capazes de dar início à cascata de eventos que culminam na ativação de uma caspase iniciadora (8 ou 9), a qual ativa a caspase-3 efetora. Inicia-se assim, a via de execução que resulta nas alterações citomorfológicas características da apoptose. (Adaptado de Elmore, 2007). ..... 17
- Figura 9 – Indução de apoptose *in vitro* em células humanas tumorais HepG2 (hepatocarcinoma), enquanto hepatócitos humanos normais L-02 não são afetados pela aplicação da Apoptina fusionada ao domínio de transdução PTD4. (a) Análise por citometria de fluxo de células HepG2 e L-02 tratadas com PTD4-Apoptina (barras

pretas) e com o controle PTD4-EGFP (barras brancas). (b) Ensaio TUNEL realizado em células HepG2 (esquerda) e L-02 (direita) tratadas com PTD4-Apoptina (acima) e com o controle PTD4-EGFP (abaixo); aumento: 200x; células coradas com H&E. (Fonte: Sun et al., 2009).....22

Figura 10 – Regressão de hepatomas humanos (HepG2) implantados em camundongos *nude* antes e após o tratamento com vetor adenoviral recombinante expressando Apoptina. (A e B) Tumores antes do início do tratamento. (C e D) Tumores não tratados, no final do experimento. (E) Regressão completa e (F) parcial do tumor pelo tratamento com o vetor adenoviral expressando a Apoptina. (Fonte: Van Der Eb et al., 2002). .....24

Figura 11 – Estrutura primária da Apoptina. Os grupos de aminoácidos (abaixo) indicados em vermelho, azul, verde e amarelo representam, respectivamente, os domínios LRS, NLS, NES e o sítio de fosforilação na treonina-108, que são representados no esquema (acima) (Adaptado de Los et al., 2009).....26

Figura 12 – Localização subcelular diferencial da Apoptina em células humanas normais e tumorais. (A) Em células primárias (normais) a Apoptina localiza-se no citoplasma (coloração verde dada pela marcação da Apoptina com GFP). (B) Em células tumorais a Apoptina situa-se exclusivamente no núcleo. Abaixo se visualiza os núcleos celulares corados em azul com DAPI. (Fonte: Los et al., 2009). .....27

Figura 13 – Esquematização simplificada do comportamento da Apoptina (A) em células humanas normais, nas quais a Apoptina acaba degradada; e (B) em células tumorais onde a Apoptina é fosforilada, acumula-se no núcleo e interage com diversos parceiros deflagrando a apoptose. ....32

Figura 14 – Esquematização da localização e tamanho das ORFs encontradas no genoma do AGV2. As barras horizontais representam o tamanho e a posição das ORFs que codificam as proteínas VP1, VP2 e VP3. Os números apresentados na figura indicam a posição na sequência de nucleotídeos do AGV2. (Adaptado de Rijsewijk et al., 2011). .....34

Figura 15 – Alinhamento das sequências de nucleotídeos das regiões codificadoras da VP3 dos variantes AGV2-T, AGV2-SM e AGV2-N1, no qual se pode verificar as diferenças entre elas. Estão destacadas em amarelo as substituições e em roxo as adições.....49

Figura 16 - Alinhamento das sequências de aminoácidos deduzidas a partir dos genes da VP3 dos variantes AGV2-T, AGV2-SM e AGV2-N1, em que se pode visualizar as diferenças nos resíduos de aminoácidos existentes entre elas. Em amarelo estão destacadas as substituições e em roxo a adição.....50

Figura 17 - Alinhamento das sequências de aminoácidos da Apoptina do CAV e das VP3 dos variantes AGV2-T, AGV2-SM e AGV2-N1. Os quadros delimitam os domínios LRS (vermelho), NLS (azul) e NES (verde). Os sítios de fosforilação preditos estão indicados por asteriscos. ....51

Figura 18 - Análise das PCRs em gel de agarose a 1%. Visualização das bandas referentes à amplificação das variantes VP3-T, VP3-SM e VP3-N1. M: 2-Log DNA Ladder (New England Biolabs).....52

Figura 19 – Efeito citopático adenoviral em células 293A - característico pelo arredondamento e lise das células formando evidentes placas virais - dez dias após a transfecção do vetor adenoviral recombinante pAd<VP3-SM>. Efeitos similares foram obtidos na transfecção dos demais vetores.....	54
Figura 20 - Análise das RT-PCRs em gel de agarose a 1%. A visualização das bandas eferentes à amplificação das variantes VP3-T, VP3-SM e VP3-N1 confirmam a transcrição dos respectivos RNAm pelo sistema construído. M: 100bp DNA Ladder (New England Biolabs).....	55
Figura 21 – Teste de viabilidade celular após a transdução com os adenovírus expressando as diferentes VP3 do AGV2. Células tumorais A549 e normais MRC-5 foram transduzidas com (a) Ad<VP3-T>, (b) Ad<VP3-SM> e (c) Ad<VP3-N1> em diferentes MOIs (0,1; 1; 10; 50). Após 72 horas, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. Resultados apresentados como médias e desvio padrão (barras de erro) de quatro experimentos. Teste <i>t</i> de Student: * <i>P</i> <0,05; ** <i>P</i> <0,01; *** <i>P</i> <0,0001. ....	57
Figura 22 – Fotografias representativas das células MRC-5 e A549 72 horas após a transdução com os adenovírus recombinantes expressando as diferentes VP3 do AGV2 com as MOIs indicadas. Acima, controle celular (CC). Imagens adquiridas em microscópio óptico invertido. Magnificação: 40X. ....	58
Figura 23 – Imagens representativas da localização nuclear da VP3 do AGV2 nas células humanas tumorais A549. VP3 marcada com anticorpo conjugado com fluoresceína e núcleo corado com Hoechst. Visualização em microscópio confocal de fluorescência. Aumento de 600X.....	60
Figura 24 - Imagens representativas da localização subcelular da VP3 do AGV2 nas células humanas normais MRC-5. Essas proteínas foram detectadas principalmente restritas ao citoplasma (a), mas também puderam ser observadas, em menor proporção, acumuladas no núcleo (b), ou presentes concomitantemente em ambos locais (c). VP3 marcada com anticorpo conjugado com fluoresceína e núcleo corado com Hoechst. Visualização em microscópio confocal de fluorescência. Aumento de 600X. ....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ACDase - Ceramidase Ácida (*Acid Ceramidase*)
- AGV2 – Girovírus Aviário 2 (*Avian Gyrovirus 2*)
- AIF – Fator Indutor de Apoptose (*Apoptosis-inducing Factor*)
- Akt (PKB) – Proteína Quinase B (*Protein Kinase B*)
- Apaf-1 – Fator 1 Ativador de Protease Apoptótica (*Apoptotic Protease Activating Factor-1*)
- APC – Subunidade do Complexo Promotor da Anáfase (*Subunit of Anaphase-Promoting Complex*)
- Apo2L – Ligante Apo2 (*Apo2 Ligand*)
- Apo3L – Ligante Apo3 (*Apo3 Ligand*)
- ASMase – Esfingomielinase Ácida (*Acid Sphingomyelinase*)
- Bcl10 – Linfoma de Células B 10 (*B-cell lymphoma 10*)
- Bcl-2 - Linfoma de Células B 2 (*B-cell lymphoma 2*)
- Bcl-2 – Proteína 2 de Linfoma de Células B (*B-cell Lymphoma Protein 2*)
- Bcl-X<sub>L</sub> – Linfoma de Células B extra-grande (*B-cell lymphoma extra-large*)
- Bid – Agonista de morte celular que interage através do domínio 3 homólogo a Bcl2 (*BH3 interacting-domain death agonist*)
- BSA – Albumina Sérica Bovina (*Bovine Serum Albumin*)
- CAD – DNase Ativada por Caspase (*Caspase-Activated DNase*)
- CAV – Vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas (*Chicken Anemia Virus*)
- CC – Controle Celular
- CDK2 – Quinase Dependente de Ciclina 2A (*Cyclin-Dependent Kinase 2*)
- cDNA – DNA complementar (*Complementary DNA*)
- CMV – Citomegalovírus
- CRM1 – Exportina 1 (Exportin 1 / *Chromosome Region Maintenance 1*)

DAPI - Dihidrocloreto de 4',6-diamidino-2-fenilindole (*4',6-diamidino-2-phenylindole*)

DDR – Resposta a Dano ao DNA (*DNA Damage Response*)

DEDAF – Fator Associado ao Efetor de Morte (*Death Effector Domain-Associated Factor*)

DEPC - Dicarbonato de dietila (*Diethylpyrocarbonate*)

DISC – Complexo Sinalizador Indutor de Morte (*Death-Inducing Signaling Complex*)

DMEM – Meio Eagle Modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)

DNA – Ácido Desoxirribonucléico (*Deoxyribonucleic Acid*)

dNTP - Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados (*Deoxynucleotide Triphosphate*)

DR3 – Receptor de Morte 3 (*Death Receptor 3*)

DR4 – Receptor de Morte 4 (*Death Receptor 4*)

DR5 - Receptor de Morte 5 (*Death Receptor 5*)

EGFP – Proteína Verde Fluorescente Reforçada (*Enhanced Green Fluorescent Protein*)

FADD – Domínio de Morte Associado à Fas (*Fas-Associated Death Domain*)

Fas – Ácido Graxo Sintetase (*Fatty Acid Synthetase*)

FasL – Ligante Fas (*Fas Ligand*)

FasR – Receptor Fas (*Fas Receptor*)

H&E – Hematoxilina e Eosina

HEPES – Ácido 4-(2-hidroetil)-1-piperazinoetano-sulfônico (*Hydroxyethyl Piperazineethanesulfonic Acid*)

HepG2 – Linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano

HER2 – Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidermal Humano (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*)

Hippi – Proteína que interage com a proteína Huntingtin (*Huntingtin interacting protein 1 protein interactor*)

HSP70 – Proteína de Choque Térmico 70 (*Heat Shock Protein 70*)

IMP $\beta$ 1 – Importina  $\beta$ 1 (*Importin  $\beta$ 1*)

ITR – Repetições Terminais Invertidas (*Inverted Terminal Repeats*)

L-02 – Linhagem celular de hepatócitos humanos

LacZ – gene codificante da  $\beta$ -galactosidase

LB – Luria-Bertani

LRS – Região rica em leucina (*Leucine-Rich Stretch*)

MEM – Meio Essencial Mínimo (*Minimum Essential Medium*)

M-MuLV - Vírus da Leucemia Murina de Moloney (*Moloney Murine Leukemia Virus*)

MOI – Multiplicidade de Infecção (*Multiplicity of Infection*)

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio

NCBI – Centro Nacional para Informação Biotecnológicas (*National Center for Biotechnology Information*)

NES – Sinal de Exportação Nuclear (*Nuclear Export Signal*)

NLS – Sinal de Localização Nuclear (*Nuclear Localization Signal*)

Nmi – Proteína que interage com N-Myc (*N-Myc Interacting Protein*)

NPC – Complexo do Poro Nuclear (*Nuclear Pore Complex*)

nt – Nucleotídeos (*Nucleotides*)

Nur77 – Receptor Nuclear 77 (*Nuclear Receptor 77*)

ORF – Fase Aberta de Leitura (*Open Reading Frame*)

pb – par de bases

PBS – Tampão Fosfato-Salino (*Phosphate Buffered Saline*)

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

PFU – Unidades Formadoras de Placa (*Plaque-Forming Unit*)

PKC – Proteína Quinase C (*Protein Kinase C*)

PML – Proteína da Leucemia Promielocítica (*Promyelocytic Leukemia Protein*)

PP2A – Proteína Fosfatase 2A (*Protein Phosphatase 2A*)

PTD4 – Domínio de Transdução Protéica 4 (*Protein Transduction Domain 4*)

PUMA – Modulador da apoptose ativador da p53 (*p53 Upregulated Modulator of Apoptosis*)

RNA – Ácido Ribonucléico (*Ribonucleic Acid*)

RNAm – RNA mensageiro

RPMI – Meio Roswell Park Memorial Institute (*Roswell Park Memorial Institute Medium*)

RT – Transcriptase Reversa (*Reverse Transcriptase*)

SFB – Soro Fetal Bovino

Smac/DIABLO – Segundo Ativador de Caspases Mitocondrial (*Second Mitochondria-derived Activator of Caspases*)

SV40 - Vírus Vacuolante Símio 40 (*Simian Vacuolating Virus 40*)

TAp73 – p73 com capacidade de transativação (*Transactivation-proficient p73*)

Taq – *Thermus aquaticus*

Thr – Treonina

TNFR1 – Receptor 1 do Fator de Necrose Tumoral (*Tumoral Necrosis Factor Receptor 1*)

TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral Alfa (*Tumoral Necrosis Factor Alpha*)

TUNEL – Marcação *in situ* das extremidades 3' de DNA pela enzima desoxinucleotidil transferase terminal (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling*)

UV – Radiação Ultravioleta

VP1 – Proteína Viral 1 (*Viral Protein 1*)

VP2 – Proteína Viral 2 (*Viral Protein 2*)

VP3 – Proteína Viral 3 (*Viral Protein 3*)

$\Delta$ Np73 – Inibidor Dominante-Negativo da p53 e Tap73 (*Dominant-Negative Inhibitor of p53 and TAp73*)



## 1. INTRODUÇÃO

O câncer é o grupo de doenças que mais mata em países economicamente desenvolvidos e a segunda maior causa de morte nos países emergentes. Além disso, os índices de novos casos e de mortes por câncer ainda continuam a crescer, principalmente em países em desenvolvimento (WHO, 2008; Jemal et al., 2011). Apesar da vasta gama de terapias existentes para o tratamento do câncer, a eliminação das células cancerosas é muito difícil e o câncer é ainda uma doença muitas vezes sem cura. Praticamente todas as terapias antineoplásicas atuais são dirigidas contra a proliferação celular e, dessa forma, esbarram na inespecificidade de ação, na dificuldade de eliminação completa das células cancerosas, no desenvolvimento de resistência aos agentes usados e ainda acarretam múltiplos efeitos tóxicos indesejados (Gottesman, 2002; Rang et al., 2012). A maior esperança para o tratamento eficaz do câncer reside na descoberta de métodos ou fármacos que sejam capazes de seletivamente eliminar as células cancerosas sem afetar o desenvolvimento adequado das células normais do organismo.

A Apoptina é uma pequena proteína codificada pelo vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV). Essa proteína causa a apoptose das células

infectadas durante o ciclo de replicação do CAV (Noteborn et al., 1994). No final da década de 1990 foi demonstrado pela primeira vez que a Apoptina é também capaz de induzir apoptose em células humanas tumorais, enquanto não tem qualquer efeito em células normais (Danen-Van Oorschot *et al.*, 1997). A partir daí, seu potencial como agente antitumoral vem sendo extensivamente analisado. Até o momento, mais de 70 linhagens celulares já se apresentaram suscetíveis a sua atividade pró-apoptótica (Noteborn, 2009) e diversos estudos pré-clínicos *in vivo* realizados em camundongos com aloenxertos de tumores humanos indicam que a Apoptina é um agente antitumoral eficiente e seguro (Backendorf et al., 2008). Além disso, a apoptose induzida pela Apoptina é independente da via da proteína p53 e insensível aos proto-oncogenes antiapoptóticos Bcl-2 e Bcl-X<sub>L</sub> (Zhuang et al., 1995; Danen-Van Oorschot; Van der Eb; Noteborn, 1999; Schoop et al., 2004). Estas características singulares indicam que a Apoptina pode ser um eficiente agente antineoplásico com potencial de atuar inclusive nos casos em que os quimioterápicos atuais são ineficazes.

Estudos recentes buscando identificar o agente etiológico de sinais clínicos relacionados à anemia em galinhas levaram à detecção do genoma de um novo vírus, denominado girovírus aviário 2 (AGV2). Este possui genoma de DNA circular fita-simples com organização genômica bastante similar ao CAV e apresenta uma identidade de nucleotídeos de aproximadamente 40% em relação a este vírus. O AGV2 codifica a VP3, uma proteína composta de 124 aminoácidos homóloga à Apoptina do CAV. Entre elas existe uma identidade de aminoácidos de 32,2% (Rijsewijk et al., 2011). Análises adicionais revelaram

a existência de variabilidade na região codificadora da VP2-VP3 do AGV2 que resulta em alterações na composição de aminoácidos da proteína VP3 dos diferentes variantes do AGV2 (Dos Santos et al., 2012). Dessa forma, a proteína VP3 do AGV2 pode, assim como a Apoptina do CAV, apresentar características que a credencie como um possível novo agente antineoplásico.

### **1.1. Objetivo Geral**

Investigar o potencial da proteína VP3 codificada pelo AGV2 em induzir seletivamente a morte de células humanas tumorais, iniciando, dessa forma, a avaliação desta proteína como um possível novo agente antitumoral.

### **1.2. Objetivos Específicos**

- Construir adenovírus recombinantes expressando três diferentes variantes da proteína VP3 do AGV2;
- Transduzir esses vírus em linhagens celulares derivadas de tumores humanos e em células humanas normais;
- Analisar a localização subcelular da VP3 do AGV2 nas células-alvo;
- Avaliar a viabilidade de células tumorais e normais transduzidas com adenovírus que expressam diferentes variantes da VP3 do AGV2.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Câncer

O câncer é o grupo de doenças que mais mata em países economicamente desenvolvidos e é a segunda maior causa de morte nos países emergentes (WHO, 2008). Só em 2008, o câncer foi responsável por 7,6 milhões de mortes (13% do total) no mundo (Ferlay et al., 2010). Nos Estados Unidos da América, uma em cada quatro mortes é causada por câncer (Siegel; Naishadham; Jemal, 2013). Além disso, as estatísticas de novos casos e de mortes por câncer continuam a crescer devido ao aumento e ao envelhecimento da população mundial, além da crescente adoção de comportamentos que elevam o risco de desenvolvimento da doença, como o tabagismo, principalmente em países em desenvolvimento. Estima-se que em 2030 o câncer seja responsável por 13,1 milhões de mortes (Jemal et al., 2011). O tipo de câncer que mais causa mortes é o de pulmão, respondendo por mais de 1,37 milhões (18%) das mortes causadas por câncer. Ele é também o tipo com maior incidência e o maior causador de mortes no sexo masculino, enquanto que nas mulheres o câncer de mama se posiciona no topo das estatísticas. Os cânceres coloretal, de estômago, hepático e de

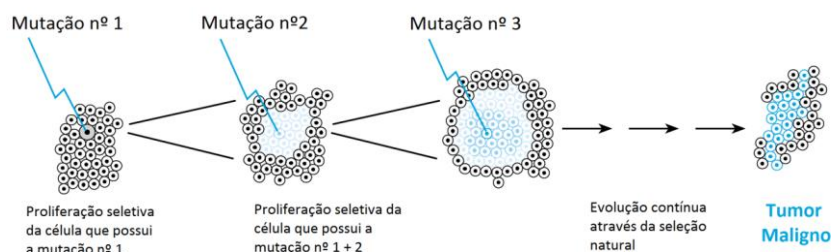
próstata figuram também entre os responsáveis pela maioria das mortes causadas por câncer (Ferlay et al., 2010).

Câncer é a denominação genérica usada para designar um conjunto de várias doenças nas quais células alteradas proliferam-se de maneira descontrolada em qualquer parte do corpo formando uma massa tumoral. Os tumores malignos podem ser extremamente graves, visto que podem apresentar um crescimento bastante rápido e as células que os compõem possuem a capacidade de penetrar nos vasos sanguíneos e/ou linfáticos e invadir qualquer outra região do corpo, produzindo metástases. Estas células cancerosas podem se infiltrar em tecidos adjacentes e continuar sua proliferação no interior destes (National Care Institute, 2013).

O desenvolvimento do câncer é um processo que ocorre em diversas etapas que refletem alterações genéticas que levam a uma progressiva transformação de células normais em células cancerosas. Esta transformação acontece através do acúmulo de mutações somáticas e de uma instabilidade genética (Hanahan; Weinberg, 2011; Lewin et al., 2004). A transformação celular está frequentemente associada à ação de determinados vírus ou carcinógenos químicos, que não geram células cancerosas diretamente, mas aumentam a probabilidade de que ocorram alterações genéticas que resultem em câncer (Rang et al., 2012).

No princípio da transformação de uma célula normal especula-se que ocorra uma mutação com perda de função em algum gene envolvido no reparo de DNA, gerando assim uma instabilidade genética. Com isso, a quantidade de

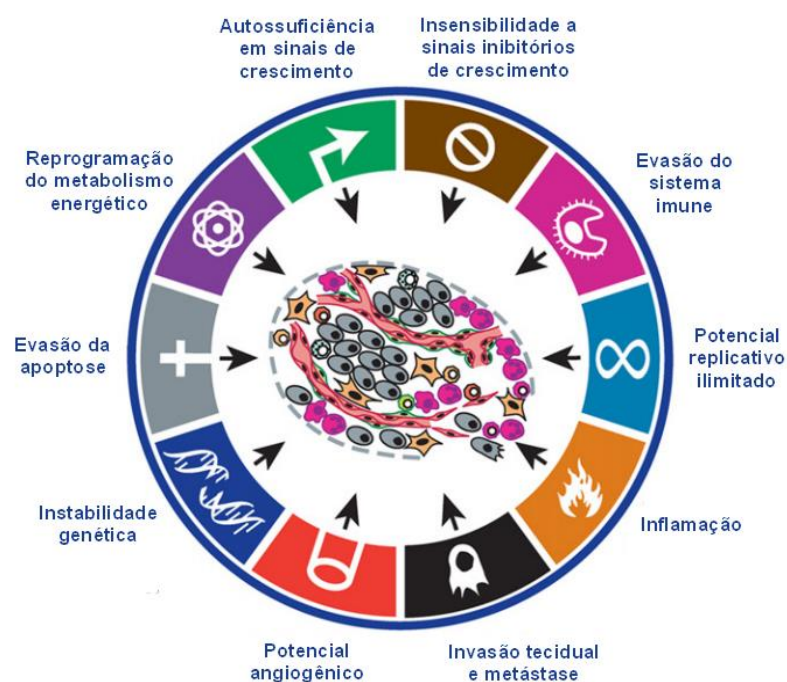
mutações que ocorrem nesta célula se eleva drasticamente. Então, diversas alterações genéticas podem ocorrer nesta célula ou em suas descendentes, o que termina criando células geneticamente distintas a partir daquela única célula inicial. A partir daí, as células que adquirirem mutações capazes de elevar seu potencial proliferativo irão gerar mais descendentes e acabarão dominando a população (Lewin et al., 2004). O desenvolvimento tumoral progride então através de um processo análogo à seleção natural darwiniana: a cada estágio durante a progressão do câncer uma população celular é selecionada, favorecendo as células que adquiriram alguma vantagem proliferativa em relação às outras (Figura 1) (Hanahan; Weinberg, 2011).



**Figura 1** - Progressão do câncer por estágios múltiplos. Sucessivas muta es capazes de oferecer alguma vantagem proliferativa acabam selecionando a popula o. (Adaptado de Strachan; Read, 2010).

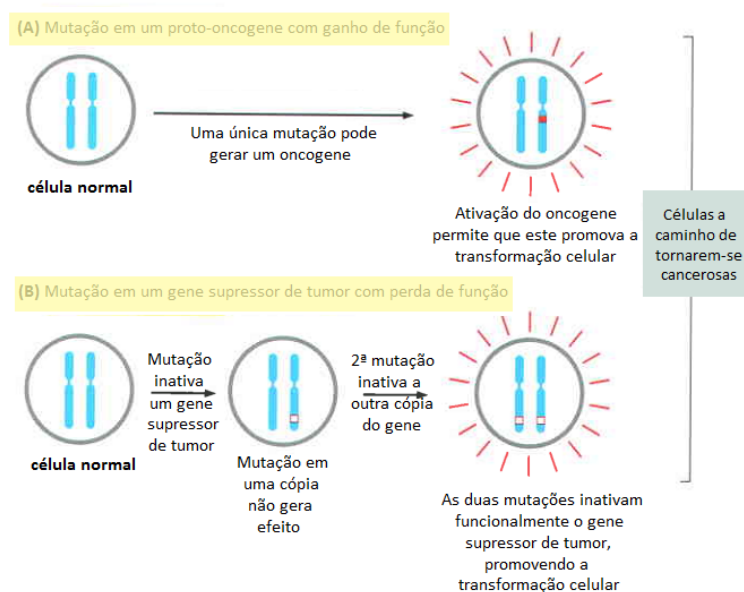
Sendo assim, células cancerosas são células que sofreram sucessivas transforma es genéticas que as levaram a perder o controle do seu ciclo celular e a adquirir novas habilidades que acabam por permitir que estas células proliferem indefinidamente e cresçam em locais indevidos (Lewin et al.,

2004). Segundo Hanahan e Weinberg (2011), estas habilidades adquiridas pelas células cancerosas podem ser divididas em oito grupos de alterações da fisiologia celular. Existindo ainda, por trás destas alterações duas características promotoras: a instabilidade genética, que acelera a aquisição de mutações vantajosas, e a inflamação, que promove a funcionalidade de várias das habilidades adquiridas (Figura 2).



**Figura 2** – Características promotoras do desenvolvimento do câncer e habilidades adquiridas pelas células cancerosas. Hanahan e Weinberg (2011) sugerem que os cânceres adquirem o mesmo grupo habilidades durante seu desenvolvimento. (Adaptado de Hanahan; Weinberg, 2011).

Comparando-se células cancerosas com células normais, podem-se identificar alguns genes-chave que estão diretamente associados à geração de células transformadas: os proto-oncogenes, que quando mutados podem ser ativados e assim, têm um efeito dominante em promover a proliferação celular; e os genes supressores de tumor, que são genes que antagonizam a proliferação ou crescimento celular e quando mutados podem perder sua função de forma recessiva (Figura 3). Na maioria dos casos, o câncer desenvolve-se a partir de uma série de mutações que se acumulam ativando proto-oncogenes e/ou inativando genes supressores de tumor (Lewin et al., 2004).



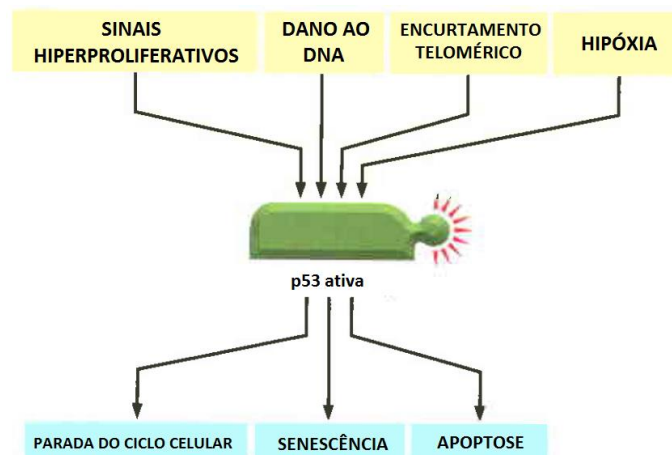
**Figura 3** – Mutações em proto-oncogenes e genes supressores de tumor podem levar à transformação celular. (A) Uma única mutação em um proto-oncogene com ganho de função pode gerar um oncogene e promover a transformação da célula. (B) Um gene supressor de tumor deve sofrer mutações com perda de função em ambas as cópias para que se promova a transformação celular. (Adaptado de Alberts et al., 2007).



### 2.1.1. p53

O gene supressor de tumor *p53* é provavelmente o mais importante gene que atua prevenindo o desenvolvimento do câncer. A perda de função da proteína *p53* codificada por este gene é a alteração genética mais comum encontrada no câncer. Em mais da metade de todos os cânceres humanos já estudados detectou-se a perda de função da *p53*, e em praticamente todos, ou esse gene ou outros componentes da mesma via de sinalização apresentam-se alterados (Lewin et al., 2004; Alberts et al., 2007; Levesque; Eastman, 2007).

Todas as células normais possuem baixos níveis de *p53*, pois esta proteína é constante e rapidamente degradada. Mas, em resposta a algum dano ao DNA, hipóxia, sinais hiperproliferativos ou encurtamento telomérico, a degradação da *p53* é bloqueada e essa proteína acumula-se na célula e acaba sendo ativada. Esta ativação pode resultar em desfechos distintos que dependerão da fase do ciclo celular em que a célula encontra-se e da severidade do dano (Figura 4). A *p53* ativada pode atuar bloqueando a progressão do ciclo celular até que o dano seja reparado, ou, caso a célula já esteja comprometida com a divisão celular, esta proteína dá início ao processo apoptótico. Nos casos em que os telômeros estão encurtados, a *p53* bloqueia a continuidade do ciclo celular e, como neste caso não há como realizar reparo, qualquer divisão celular é impedida indefinidamente (senescência celular) (Lewin et al., 2004; Levine et al., 2006; Alberts et al., 2007).



**Figura 4** – A p53 atua como um sensor de estresse celular. Em resposta a diversos estímulos lesivos esta proteína é ativada podendo desencadear diferentes desfechos à célula. (Adaptado de Alberts et al., 2007).

Nota-se, portanto, que a p53 está envolvida no controle do ciclo celular, na manutenção da estabilidade genética e na apoptose, o que fundamenta sua importância para a homeostase da célula e o porquê desse gene ser tão importante para o desenvolvimento do câncer (Lewin et al., 2004).

Sendo assim, células desprovidas da p53 ou que possuam cópias defeituosas do gene possuem capacidade de evadir a apoptose, bem como são capazes de continuar se dividindo mesmo que seu DNA esteja danificado ou alterado. Normalmente estas células acabam morrendo, mas elas podem sobreviver com um genoma modificado, acumulando sucessivas mutações. A perda de genes supressores de tumor e a ativação de oncogenes podem ser alterações decorrentes desta instabilidade genética e, dessa maneira, o câncer pode se desenvolver e tornar-se mais agressivo. Além disso, a perda da p53 também torna muitas células cancerosas menos sensíveis à radioterapia e a

vários quimioterápicos, visto que muitos destes tratamentos necessitam da sinalização da p53 para que a célula entre em apoptose ou interrompa seu ciclo (Alberts et al., 2007; Lowe et al., 1993).

### **2.1.2. Tratamentos**

O câncer pode ser tratado através da retirada cirúrgica do tumor ou pela destruição das células cancerosas por agentes químicos ou radiação. Entretanto, seja qual for a abordagem utilizada, é extremamente difícil erradicar todas as células transformadas. Após o tratamento, as células cancerosas remanescentes podem regenerar o tumor. Além disso, como as células cancerosas mutam rapidamente, elas podem desenvolver resistência ao tratamento usado para eliminá-las (Alberts et al., 2007).

A radiação e a grande maioria dos agentes quimioterápicos usados atualmente afetam a proliferação celular por causarem danos ao DNA. Estas terapias matam células cancerosas, pois estas apresentam altas taxas proliferativas e possuem uma menor habilidade de sobreviver a este dano do que as células normais. Entretanto, esses tratamentos afetam também as células normais que apresentam rápida divisão. Disso decorrem os vários efeitos tóxicos indesejados - como mielossupressão, cicatrização deficiente, lesão de mucosas, alopecia, esterilidade, teratogenicidade e depressão no crescimento de crianças – detectados em pacientes em tratamento antineoplásico (Alberts et al., 2007; Rang et al., 2012).

Além da radio e quimioterapia, outras abordagens se fazem valer de características singulares de determinados tecidos. Tumores derivados de tecidos sensíveis a hormônios podem ser hormônio-dependentes, então o tratamento com antagonistas ou inibidores destes hormônios pode ser útil para inibir o crescimento destes tumores. Outros exemplos são: a utilização de anticorpos para bloquear proteínas superexpressas (como, por exemplo, o anticorpo monoclonal trastuzumab que bloqueia o receptor HER2, superexpresso em muitos cânceres de mama) ou para carrear toxinas especificamente para células que apresentem determinado antígeno, e a administração de isótopos radioativos que sabidamente acumulam-se em dado órgão ou tecido (por exemplo,  $^{131}\text{I}$  para tratar tumores na tireoide) (Rang et al., 2012).

Abordagens como a inibição da angiogênese e estimulação da resposta imune são terapias que não visam diretamente às células tumorais, mas dificultam sua manutenção. Esses também são utilizados conjuntamente com outros tratamentos (Alberts et al., 2007).

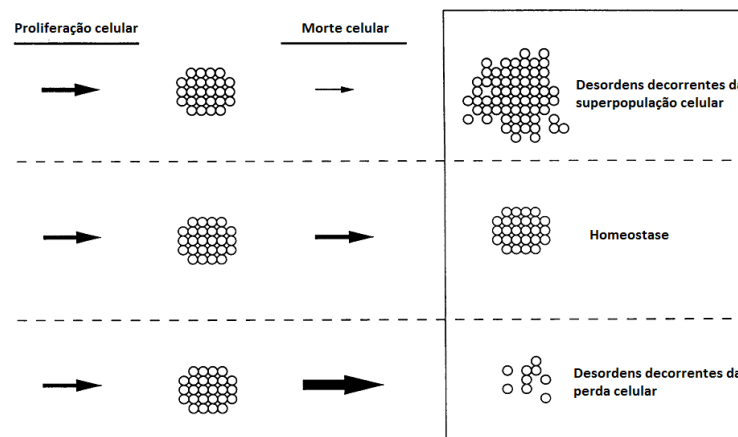
Apesar da vasta gama de terapias existentes para o tratamento do câncer, a eliminação das células cancerosas é muito difícil e o câncer é ainda uma doença muitas vezes sem cura. Praticamente todas as terapias atuais são dirigidas contra a proliferação celular e, dessa forma, esbarram na inespecificidade de ação, na dificuldade de eliminação completa das células cancerosas, no desenvolvimento de resistência aos agentes antineoplásicos, além de acarretarem múltiplos efeitos tóxicos indesejados (Gottesman, 2002;

Rang et al., 2012). A maior esperança para o tratamento eficaz do câncer reside na descoberta de métodos que possam seletivamente eliminar as células cancerosas sem afetar o desenvolvimento adequado das células normais do organismo. Isso pode ser alcançado através do conhecimento das alterações celulares induzidas por cada tipo de câncer e usá-lo para a prescrição de terapias individuais específicas, ou através da descoberta ou do desenvolvimento de moléculas capazes de restaurar vias de controle alteradas ou induzir a morte seletiva das células cancerosas (Alberts et al., 2007).

## **2.2. Apoptose**

Doenças neurodegenerativas, processos isquêmicos, infecções virais ou bacterianas e doenças autoimunes, assim como o câncer, são doenças associadas a um desbalanço entre a proliferação e morte celular (Favarolo et al, 2012).

Para a manutenção da homeostase celular, tão importante quanto a regulação da proliferação celular é o controle das células que devem entrar em apoptose (Figura 5) (Thompson, 1995).

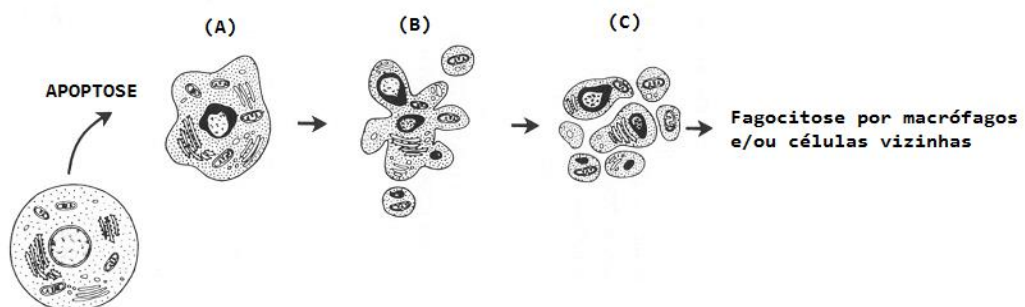


**Figura 5** – Efeitos do desbalanço entre a proliferação e morte celular na homeostase. As taxas de proliferação e morte celular estão indicadas pela espessura das setas. Mantida a taxa de proliferação, alterações na taxa de morte celular podem levar ao acúmulo de células ou a perda celular, e conseqüentemente a desordens decorrentes destes desbalanços. (Adaptado de Thompson, 1995).

A “morte celular programada”, mais conhecida como apoptose, é um processo fisiológico ativo de morte celular que ocorre de forma ordenada visando à eliminação de células supérfluas, danificadas ou alteradas sem que seja provocada resposta imune ou inflamação no local (Earnshaw, 1995). A morte e remoção celular ocorrem por toda a vida do organismo: durante o desenvolvimento embrionário a apoptose é essencial para a correta formação dos tecidos e órgãos, e durante toda a vida o processo apoptótico atua como um mecanismo homeostático que visa à manutenção das populações celulares saudáveis (Fuchs; Steller, 2011). Estima-se que em um ser humano adulto aproximadamente dez bilhões de novas células são geradas por dia apenas para repor aquelas que morrem por apoptose (Renehan et al., 2001).

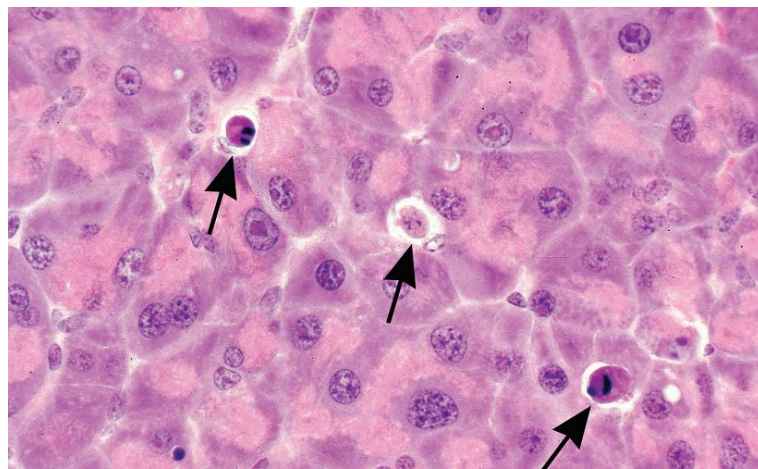
### 2.2.1. Morfologia da apoptose

Durante a fase inicial do processo apoptótico é possível visualizar algumas alterações na estrutura celular (Figura 6). Por meio de microscópio óptico pode-se notar o encolhimento celular e a picnose (Figura 7) (Kerr et al., 1972). Com o encolhimento da célula, o citoplasma se torna mais denso e as organelas apresentam-se mais fortemente empacotadas. A picnose, resultante da condensação da cromatina, é considerado o traço mais característico da apoptose. O núcleo fragmenta-se e formam-se processos celulares que se soltam da célula formando estruturas conhecidas como corpos apoptóticos. Estes consistem em citoplasma, organelas fortemente empacotadas, podendo ou não possuir fragmentos nucleares, sendo envolvidos por uma membrana plasmática intacta. Subsequentemente, estes corpos apoptóticos são fagocitados por macrófagos e/ou células vizinhas e são finalmente degradados (Elmore, 2007).



**Figura 6** – Alterações morfológicas visualizadas durante a apoptose. (A) Encolhimento celular e picnose. (B) Fragmentação do núcleo e brotamento dos processos celulares. (C) Fragmentação em corpos apoptóticos. (Adaptado de Majno; Joris, 1995).

Não há reação inflamatória associada ao processo de apoptose, uma vez que as células apoptóticas não liberam seu conteúdo no interstício e os corpos apoptóticos são muito rapidamente fagocitados por células vizinhas. Além disso, estas células fagocíticas não secretam praticamente nenhum mediador inflamatório em resposta à fagocitose dos corpos apoptóticos (Savil; Fadok, 2000; Kurosaka et al., 2003).



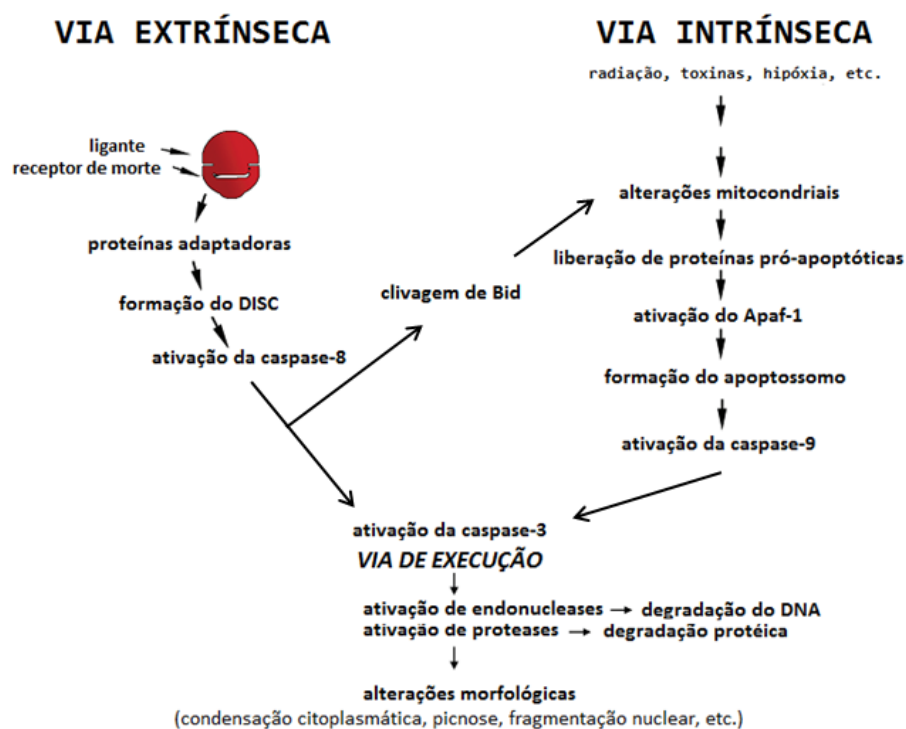
**Figura 7** – Fotomicrografia de uma secção de pâncreas exócrino de camundongo. Células apoptóticas indicadas por setas, nas quais se visualizam o encolhimento celular, condensação citoplasmática, picnose e fragmentação nuclear. Nota-se também a ausência de processo inflamatório. Coloração Hematoxilina & Eosina. (Fonte: Elmore, 2007).

### 2.2.2. As vias apoptóticas

A iniciação do processo apoptótico é desencadeada principalmente por duas vias de sinalização (Figura 8): a via extrínseca, que é deflagrada em resposta especialmente a estímulos extracelulares, e a via intrínseca, ativada por moduladores internos à própria célula. Estas vias convergem para um



mesmo ponto crucial: a conversão de pró-caspases em caspases, proteases cuja ativação é o evento bioquímico que resulta na execução da apoptose e é o maior responsável pelas modificações estruturais visualizadas nas células apoptóticas (Russo et al., 2006).



**Figura 8** – Representação dos principais eventos que ocorrem durante as vias de iniciação da apoptose. Cada uma das vias necessita de sinais desencadeadores específicos capazes de dar início à cascata de eventos que culminam na ativação de uma caspase iniciadora (8 ou 9), a qual ativa a caspase-3 efetora. Inicia-se assim, a via de execução que resulta nas alterações citomorfológicas características da apoptose. (Adaptado de Elmore, 2007).

### **2.2.2.1. Via extrínseca**

A via extrínseca necessita da interação de um ligante com um receptor transmembrana capaz de transmitir a sinalização de morte da superfície extracelular para o interior da célula. Por isso os receptores envolvidos nesta sinalização são chamados de “receptores de morte” (Locksley et al., 2001). Os ligantes e seus correspondentes “receptores de morte” mais conhecidos até o momento são FasL/FasR, TNF- $\alpha$ /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 e Apo2L/DR5 (Elmore, 2007).

Uma vez que ocorra a interação entre um ligante e seu respectivo receptor na superfície celular, proteínas adaptadoras intracelulares ligam-se ao domínio intracelular do receptor chamado de “domínio de morte” (Hsu et al., 1995; Wajant, 2002). Esta interação resulta na associação da pró-caspase-8 formando o “complexo de sinalização indutora de morte” (DISC). Por fim, a pró-caspase-8 é ativada e assim a fase de execução da apoptose inicia-se (Kischkel et al., 1995).

### **2.2.2.2. Via intrínseca**

A ausência de determinados fatores de crescimento, citocinas ou hormônios, bem como a presença de toxinas, radicais livres, infecções, hipertermia, hipóxia ou exposição à radiação, são estímulos capazes de provocar alterações na membrana mitocondrial. Essas alterações resultam na

liberação de proteínas pró-apoptóticas do espaço intermembranas para o citoplasma, desencadeando a via intrínseca da apoptose (Saelens et al., 2004).

A liberação das proteínas pró-apoptóticas citocromo *c* e Smac/DIABLO acabam por ativar o Apaf-1, o qual oligomeriza-se formando uma estrutura chamada de apoptossomo. Este recruta e ativa a pró-caspase-9, dando início à fase de execução da apoptose (Du et al., 2000; Garrido et al., 2005). Concomitantemente, outras proteínas pró-apoptóticas (AIF, endonuclease G e CAD) são também liberadas da mitocôndria e são translocadas para o núcleo da célula, causando a fragmentação e condensação do DNA (Elmore, 2007).

### **2.2.2.3. Comunicação entre as vias**

Mesmo que as duas vias apoptóticas ocorram independentemente uma da outra, existe uma comunicação entre elas mediada pela proteína pró-apoptótica Bid. A caspase-8, ativada no fim da via extrínseca, é capaz de clivar Bid que por sua vez é translocada para a mitocôndria e induz a liberação de citocromo *c* (Esposti, 2002).

### **2.2.2.4. Via de execução**

Ambas as vias, intrínseca e extrínseca, convergem para a mesma via de execução da apoptose que se inicia com a ativação das caspases efetoras.

As caspases, tidas como as protagonistas do processo apoptótico, são proteínas proteolíticas que reconhecem determinadas sequências de aminoácidos em outras proteínas e as degradam. As caspases são expressas na forma inativa (pró-caspases) e uma vez ativadas podem ativar outras pró-caspases, permitindo a iniciação de uma cascata de proteases. Além disso, algumas pró-caspases podem se agregar e se autoativarem; enquanto outras atuam clivando uma gama de proteínas-alvo que levam à desintegração da célula em apoptose (Hengartner, 2000).

Tanto a caspase-8 (ativada no fim da via extrínseca da apoptose) quanto a caspase-9 (ativada pela via intrínseca) podem ativar a caspase-3, considerada a caspase efetora mais importante na apoptose. A caspase-3 atua sobre substratos específicos promovendo a clivagem e condensação do DNA, a reorganização do citoesqueleto e o desmantelamento da célula em corpos apoptóticos (Hengartner, 2000; Elmore, 2007).

Por fim, ocorre a fagocitose dos fragmentos celulares por macrófagos e/ou células vizinhas (Wickman; Julian; Olson, 2012). O reconhecimento dos corpos apoptóticos por estas células ocorre devido à expressão de marcadores de superfície celular. Dentre estes, a fosfatidilserina é o mais conhecido. Este fosfolípido ocorre normalmente restrito à face citosólica da membrana plasmática, enquanto que em células apoptóticas ele é exteriorizado e aparece exposto na face externa da membrana (Fadok et al., 2001; Mariño; Kroemer, 2013).

### **2.3. Apoptina**

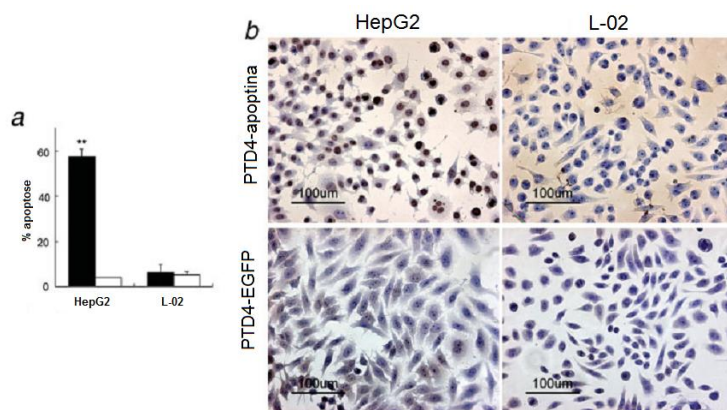
O vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV; gênero *Gyrovirus*; família *Circoviridae*) foi inicialmente descrito por Yuasa e colaboradores (1979) e desde então foi detectado em galinhas em todo o mundo. É um vírus economicamente importante na avicultura, visto que aves infectadas com esse vírus podem apresentar um baixo crescimento, anorexia, podendo ainda ocorrer a morte dessas aves (Zanella; Brentano, 2012).

Uma das proteínas expressa pelo CAV, a VP3, está associada com a indução da apoptose nas células infectadas (células hematopoiéticas e timócitos, principalmente). A expressão *in vitro* desta proteína mostrou-se capaz de induzir a apoptose, como observado na infecção pelo CAV, mesmo quando ela era a única proteína derivada deste vírus a ser sintetizada pela célula. Com isso, essa proteína passou a ser denominada de Apoptina (Noteborn et al., 1994).

#### **2.3.1. Atividade pró-apoptótica tumor-seletiva da Apoptina**

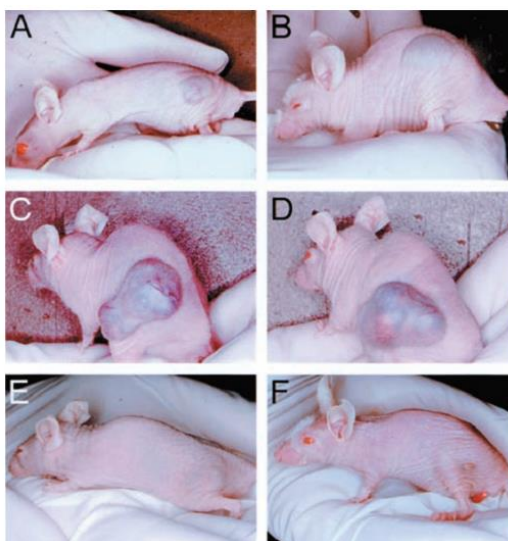
A característica mais interessante que vem, desde 1997, sendo observada nesta proteína é que ela é capaz de induzir a apoptose em linhagens celulares derivadas de uma grande variedade de tumores humanos. Entre estas figuram linhagens celulares derivadas de hepatomas, osteosarcomas, melanomas, linfomas, colangiocarcinoma, carcinoma de cólon, tumor de mama, de pulmão, de bexiga e gliomas (Noteborn et al., 1998;

Backendorf et al., 2008; Li et al., 2012; An et al., 2013). Até agora, mais de 70 linhagens de células humanas tumorais ou transformadas já demonstraram ser suscetíveis à ação da Apoptina. Por outro lado, a Apoptina não induz apoptose em células humanas normais não-transformadas, tais como queratinócitos, células endoteliais, hepatócitos, fibroblastos e células-tronco hematopoiéticas (Figura 9) (Danen-van Oorschot et al., 1997; Backendorf et al., 2008). Ela também é capaz de induzir a apoptose em fibroblastos normais transformados pelo vírus SV40 e em células de indivíduos com síndromes do câncer hereditário tratadas com radiação UV (Danen-van Oorschot et al., 1997; Zhang et al., 2004; Zhang et al., 1999). Isso indica que a Apoptina é capaz de identificar estágios iniciais da transformação oncogênica e que sua atividade é dependente dessa transformação (Backendorf et al., 2008).



**Figura 9** – Indução de apoptose *in vitro* em células humanas tumorais HepG2 (hepatocarcinoma), enquanto hepatócitos humanos normais L-02 não são afetados pela aplicação da Apoptina fusionada ao domínio de transdução PTD4. (a) Análise por citometria de fluxo de células HepG2 e L-02 tratadas com PTD4-Apoptina (barras pretas) e com o controle PTD4-EGFP (barras brancas). (b) Ensaio TUNEL realizado em células HepG2 (esquerda) e L-02 (direita) tratadas com PTD4-Apoptina (acima) e com o controle PTD4-EGFP (abaixo); aumento: 200x; células coradas com H&E. (Fonte: Sun et al., 2009).

Diversos estudos pré-clínicos *in vivo* foram realizados nos quais células humanas tumorais foram implantadas em camundongos e estes tratados com a Apoptina. A administração intratumoral da proteína ou de vetores expressando a Apoptina resultou em uma significativa diminuição do crescimento tumoral, regressão do enxerto, e em alguns casos, até mesmo em regressão completa do tumor (Figura 10). Nenhum efeito deletério foi detectado clinicamente ou nos tecidos adjacentes ao tumor, evidenciando que a Apoptina trata-se de um eficiente e seguro agente antitumoral (Pietersen et al., 1999; Sun et al., 2009; Van Der Eb et al., 2002; Pan et al., 2010; Li et al., 2013). Adicionalmente, vários trabalhos demonstram que quando a Apoptina é usada combinada com outros agentes antineoplásicos a regressão tumoral observada é significativamente maior do que quando estes são administradas isoladamente (Olijslagers et al., 2007; Liu et al., 2008; Jin et al., 2011; Fang et al., 2012; Yuan et al. 2013).



**Figura 10** – Regressão de hepatomas humanos (HepG2) implantados em camundongos *nude* antes e após o tratamento com vetor adenoviral recombinante expressando Apoptina. (A e B) Tumores antes do início do tratamento. (C e D) Tumores não tratados, no final do experimento. (E) Regressão completa e (F) parcial do tumor pelo tratamento com o vetor adenoviral expressando a Apoptina. (Fonte: Van Der Eb et al., 2002).

Uma propriedade muito interessante da Apoptina é a sua habilidade de induzir apoptose em células tumorais independentemente da proteína p53 (Zhuang et al., 1995; Li et al., 2013). Em concordância com esta característica, foi demonstrado também que proteínas inibidoras da sinalização apoptótica mediada pela p53 não inibem a atividade apoptótica da Apoptina (Danen-van Oorschot et al., 1997; Schoop et al., 2004). Surpreendentemente, a superexpressão de Bcl-2, um inibidor da apoptose mediada pela p53, é inclusive capaz de estimular a apoptose induzida pela Apoptina (Danen-van Oorschot, et al., 1999). Do ponto de vista terapêutico estas características são de extrema relevância, pois a perda de função da p53 e a superexpressão de



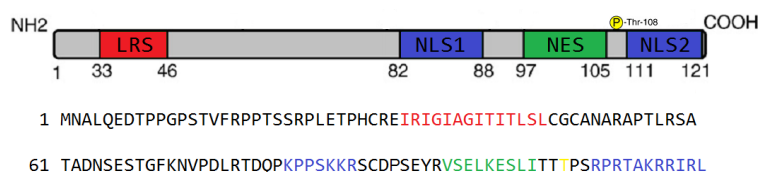
Bcl-2 são alterações frequentes nas células tumorais e geralmente resultam numa maior resistência aos agentes usados no tratamento contra o câncer (Liu, 2009; Hanahan; Weinberg, 2011).

Todos esses marcantes atributos constatados na Apoptina credenciam esta proteína como um promissor candidato a ser usado no tratamento antitumoral. A capacidade da Apoptina em induzir apoptose unicamente em células tumorais indica que um tratamento baseado nesta proteína pode não apresentar os efeitos tóxicos indesejados verificados quando são empregados os agentes antineoplásicos convencionais. Além disso, a Apoptina age de forma independente da p53 e tem atividade mesmo em células que apresentam superexpressão de certos inibidores da apoptose, o que sugere que esta proteína pode apresentar atividade antineoplásica mesmo nos casos em que as terapias antitumorais atuais não são eficazes (Noteborn et al., 1998; Noteborn, 2009).

### **2.3.2. Estrutura**

A Apoptina é composta por 121 aminoácidos e não apresenta homologia com qualquer proteína celular conhecida (Noteborn et al., 1991). Esta proteína possui uma alta porcentagem de resíduos de serina e treonina, regiões ricas em prolina e um acúmulo de resíduos básicos na região C-terminal (Noteborn, 2005). Entre os resíduos 33-46 a Apoptina possui uma região hidrofóbica rica em leucina (LRS) envolvida na sua auto-associação e interação com outras proteínas. Na extremidade C-terminal encontra-se uma

sequência de localização nuclear (NLS) bipartida (resíduos 82-88 e 111-121) e entre estas duas sequências (resíduos 97-105) localiza-se um sinal de exportação nuclear (NES). Um sítio acessível de fosforilação é encontrado na treonina localizada na posição 108, o que permite interação com outras proteínas e modificação por ação de quinases (Figura 11) (Maddika et al., 2006; Los et al., 2009).

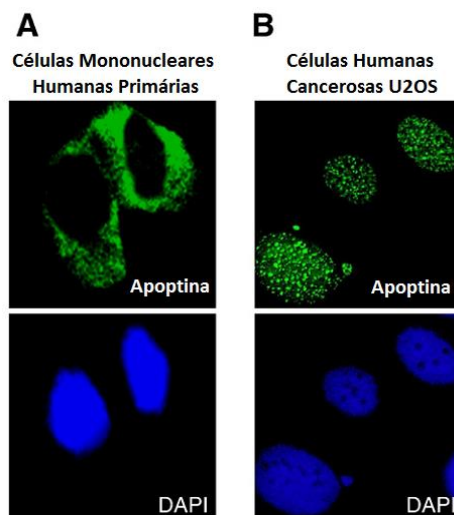


**Figura 11** – Estrutura primária da Apoptina. Os grupos de aminoácidos (abaixo) indicados em vermelho, azul, verde e amarelo representam, respectivamente, os domínios LRS, NLS, NES e o sítio de fosforilação na treonina-108, que são representados no esquema (acima) (Adaptado de Los et al., 2009).

### 2.3.3. Localização subcelular diferencial da Apoptina

O mecanismo pelo qual a Apoptina consegue distinguir as células tumorais das normais ainda não está totalmente elucidado, mas parece estar relacionado com a localização subcelular diferencial desta proteína nestas células. Enquanto a Apoptina se localiza no citoplasma de células normais, a mesma é encontrada acumulada no núcleo de células tumorais ou transformadas (Figura 12) (Danen-van Oorschot et al., 1997; Danen-van Oorschot et al., 2003; Los et al., 2009; Sun et al., 2009). Ainda que não sejam conhecidos todos os mecanismos moleculares que determinam esta diferença

na localização subcelular da proteína, os domínios funcionais presentes na Apoptina ajudam a elucidar alguns pontos desse evento.



**Figura 12** – Localização subcelular diferencial da Apoptina em células humanas normais e tumorais. (A) Em células primárias (normais) a Apoptina localiza-se no citoplasma (coloração verde dada pela marcação da Apoptina com GFP). (B) Em células tumorais a Apoptina situa-se exclusivamente no núcleo. Abaixo se visualiza os núcleos celulares corados em azul com DAPI. (Fonte: Los et al., 2009).

Como muitas outras macromoléculas, a Apoptina não é capaz de passar pela membrana nuclear das células e necessita ser ativamente transportada para o interior ou para fora do núcleo. A sequência de localização nuclear (NLS), encontrada na extremidade C-terminal da Apoptina, favorece a interação com a importina IMP $\beta$ 1 que medeia seu transporte para o núcleo através do complexo do poro nuclear (NPC) (Poon et al., 2005). Quando o complexo importina/proteína chega à extremidade citoplasmática do NPC, a proteína é liberada no núcleo, enquanto a importina é redirecionada de volta ao citoplasma (Figura 13) (Ding et al., 2010). Dessa maneira a Apoptina pode ser

transportada para dentro do núcleo, onde ela é capaz de induzir a apoptose. Porém, já foi demonstrado que uma translocação forçada da Apoptina para o núcleo de células normais não resulta na indução dos efeitos apoptóticos nestas células. Isso indica que sua atividade não é mediada apenas pela compartimentalização e outros eventos devem ser necessários para que a Apoptina possa efetivamente exercer sua atividade pró-apoptótica (Danen-van Oorschot et al., 2003; Guelen et al., 2004).

Nos resíduos 97-105 da Apoptina localiza-se a sequência de exportação nuclear (NES), a qual pode interagir com a exportina CRM1 (Poon et al., 2005). Esta exportina é capaz de transportar a Apoptina do núcleo para o citoplasma através do NPC (Figura 13) (Maddika et al., 2006).

A Apoptina, como mencionado anteriormente, acumula-se no núcleo de células tumorais e no citoplasma de células normais, todavia ela é igualmente importada para o núcleo de ambas as células. No entanto, nas células normais esta proteína é exportada pela CRM1 de volta para o citoplasma onde, por fim, ela forma agregados e é degradada por proteossomos (Lanz et al., 2012). Por outro lado, nas células tumorais a Apoptina se acumula no núcleo (Figura 13). Este acúmulo parece ocorrer devido à ineficiente remoção desta proteína do núcleo, tradicionalmente relacionada com o mascaramento do NES resultante da fosforilação da Treonina-108 (Poon et al., 2005; Maddika, 2006). A enzima responsável por esta fosforilação parece ser a quinase dependente de ciclina 2 (CDK2). A enzima quinase Akt associa-se com a Apoptina, é ativada e acaba sendo, junto com a Apoptina, translocada para o núcleo. Subsequentemente,

Akt ativa CDK2 que, por sua vez, fosforila a Apoptina no resíduo de Treonina-108 (Maddika et al., 2009).

Recentemente, Kucharski e colaboradores (2011) propuseram que a localização subcelular diferencial da Apoptina está vinculada à sinalização de resposta a dano ao DNA (DDR). Esta via está constitutivamente ativa na maioria das células transformadas em decorrência do estresse replicativo, e através de sinais dessa via a localização nuclear da Apoptina é determinada (Kucharski et al., 2011).

#### **2.3.4. Indução da apoptose**

Uma vez que a Apoptina esteja fosforilada e acumulada no núcleo das células tumorais ela pode deflagrar o processo apoptótico. Sabe-se que a morte da célula é alcançada através da ativação da via intrínseca de iniciação da apoptose induzida pela perda do potencial transmembrana da mitocôndria, com a consequente liberação de citocromo c, ativação do Apaf-1 e da caspase-9 (Danen-van Oorschot; Van Der Eb; Noteborn, 2000; Burek et al., 2006). Todavia, de que forma a via apoptótica é iniciada e que outras vias estão envolvidas no processo são questões ainda não satisfatoriamente esclarecidas.

Nos últimos dez anos, diversos trabalhos buscando desvendar detalhes de como a Apoptina induz a morte das células tumorais vêm sendo executados, propondo o envolvimento de várias vias de sinalização e moléculas participantes no seu mecanismo de ação (Figura 13). Entre esses mecanismos encontram-se a indução da catástrofe mitótica, a modulação da

via da esfingomielina-ceramida, e a participação das moléculas Nur77, APC1, PP2A, p73 e HSP70, descritos brevemente abaixo.

Em 2005, Maddika e colaboradores sugeriram que o acúmulo da Apoptina no núcleo leva à transmissão de um sinal pró-apoptótico para a mitocôndria através do receptor esteroide nuclear Nur77. Quando localizado no núcleo, o Nur77 atua como um fator de transcrição. Entretanto, em resposta a algum estímulo, a Apoptina nesse caso, o Nur77 é translocado para a mitocôndria onde inicia a via intrínseca da apoptose induzindo a liberação do citocromo c (Maddika et al., 2005).

Além disso, Teodoro e colaboradores (2004) demonstraram que a Apoptina associa-se com o APC1, uma subunidade do complexo promotor da anáfase/ciclossomo (APC/C), inibindo a formação deste complexo nas células tumorais. Conseqüentemente, a célula fica estagnada na fase G2/M do ciclo celular e a apoptose é induzida (Teodoro et al., 2004).

A via esfingomielina-ceramida também parece ser alvo da Apoptina na indução de apoptose nas células tumorais. Sabe-se que altos níveis de ceramida resultam na indução de apoptose em células tumorais (Ogretmen; Hannun, 2004). Liu e colaboradores (2006) evidenciam que a Apoptina induz a geração de grande quantidade de ceramida através da ativação da esfingomielinase ácida (ASMase) e inibição da ceramidase ácida (ACDase).

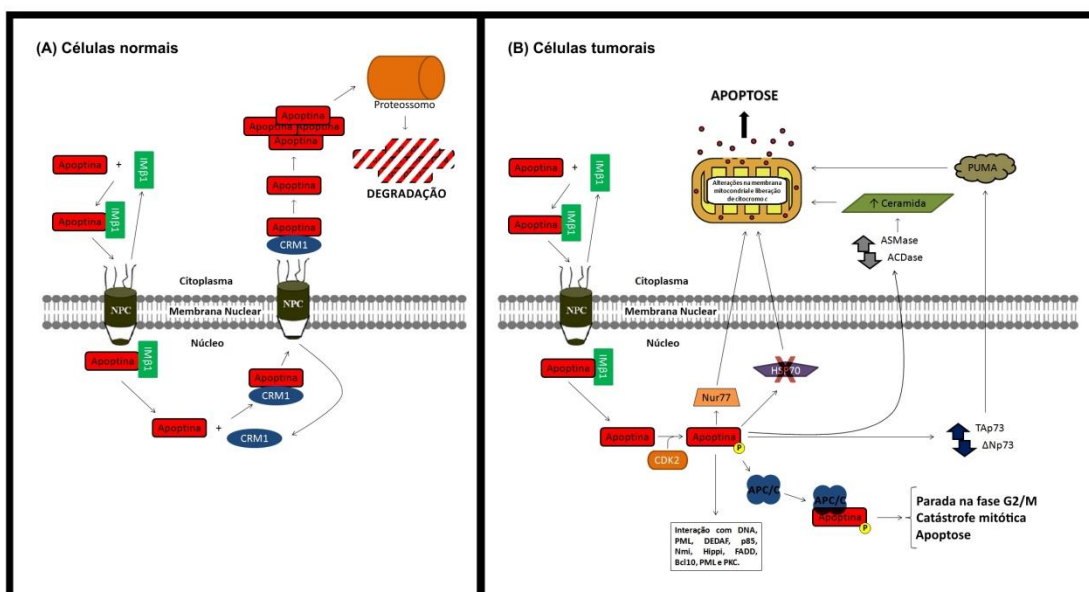
A ação da Apoptina em células tumorais também está associada ao desbalanço da concentração de determinadas proteínas celulares. Em 2012, foi demonstrado por Zimmerman e colaboradores que a seletividade de ação da

Apoptina está de alguma forma associada aos baixos níveis da proteína fosfatase 2A (PP2A), uma enzima que participa de diversas vias de sinalização celular, encontrados nas células tumorais (Zimmerman et al., 2012). Além disso, o equilíbrio entre isoformas da p73, um membro da família p53, encontra-se alterado pela Apoptina em células tumorais. A Apoptina promove uma maior estabilidade da isoforma TAp73, enquanto induz a degradação da  $\Delta Np73$  em células tumorais. Essas alterações induzem a ativação do modulador pró-apoptótico PUMA e a consequente indução da apoptose de forma independente da p53 (Klanrit et al., 2008; Taebunpakul et al., 2012). Outra proteína cuja concentração é afetada pela Apoptina é a proteína de choque térmico 70 (HSP70), um fator anti-apoptótico altamente expresso em células tumorais, enquanto que níveis basais são encontrados em células normais. Yuan e colaboradores (2013) propuseram que a Apoptina induz a apoptose nas células tumorais suprimindo a expressão da HSP70 (Yuan et al., 2013a).

Recentemente, em 2013, Lanz e colaboradores (2013) demonstraram que a Apoptina desencadeia a apoptose em células tumorais em divisão através da indução da catástrofe mitótica. Este é um mecanismo relacionado à detecção de falhas durante o processo mitótico que leva a morte celular ou senescência. A inibição da formação do APC/C por ação da Apoptina em células tumorais leva à perda do controle dos *checkpoints* mitóticos, a um ciclo de mitose mais demorado e à formação de fusos mitóticos anormais, caracterizando a catástrofe mitótica que acarreta a morte da célula (Lanz et al., 2013).

Além disso, a Apoptina acumulada no núcleo parece interagir diretamente com o DNA (Leliveld et al., 2004) e com diversas outras proteínas, como DEDAF, p85, Nmi, Hippi, FADD, Bcl10, PML e PKC (Zhou et al., 2012).

Os diversos estudos realizados vêm demonstrando que a atividade pró-apoptótica tumor-seletiva da Apoptina não é fruto de apenas uma via de sinalização e sim de um intrincado processo envolvendo várias alterações conformacionais, interações com diversas moléculas, fluxo núcleo-citoplasmático de proteínas e modulação do ciclo celular, entre outros (Zhou et al., 2012).



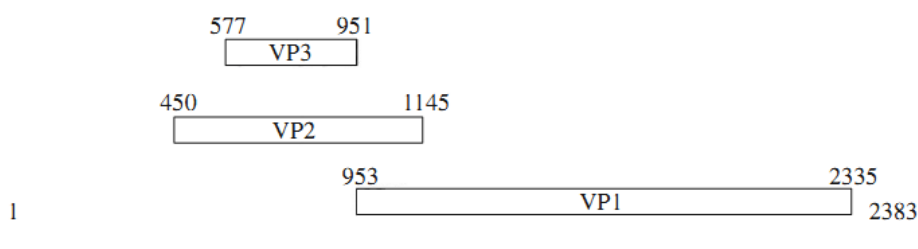
**Figura 13** – Esquematização simplificada do comportamento da Apoptina (A) em células humanas normais, nas quais a Apoptina acaba degradada; e (B) em células tumorais onde a Apoptina é fosforilada, acumula-se no núcleo e interage com diversos parceiros deflagrando a apoptose.



## 2.4. Girovírus Aviário 2

Estudos recentes buscando identificar o agente etiológico de problemas clínicos em galinhas levaram à detecção de um novo vírus que foi denominado de girovírus aviário 2 (AGV2) (Rijsewijk et al., 2011). Este vírus parece estar, assim como o CAV, mundialmente disseminado (Dos Santos et al., 2012).

O genoma do AGV2 é circular, de fita simples e possui 2383 nucleotídeos. Ele é organizado de forma similar ao genoma do CAV e compartilha uma identidade de nucleotídeos de aproximadamente 40% com este vírus. Através da análise da sequência de nucleotídeos do AGV2 foram identificadas três fases abertas de leitura (ORFs) parcialmente sobrepostas que codificam proteínas homólogas às proteínas VP1, VP2 e VP3 do CAV (Figura 14). A comparação da sequência de aminoácidos deduzida através da tradução da ORF1 com a VP2 codificada pelo CAV mostra uma identidade de 40,3%. A ORF3 apresenta identidade de 38,8% com a VP1 expressa pelo CAV. Já a ORF2 codifica a proteína VP3, com 32,2% de identidade com a Apoptina do CAV (Rijsewijk et al., 2011).



**Figura 14** – Esquematização da localização e tamanho das ORFs encontradas no genoma do AGV2. As barras horizontais representam o tamanho e a posição das ORFs que codificam as proteínas VP1, VP2 e VP3. Os números apresentados na figura indicam a posição na sequência de nucleotídeos do AGV2. (Adaptado de Rijsewijk et al., 2011).

Dos Santos e colaboradores (2012) padronizaram uma reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar o AGV2 em amostras de DNA, a qual amplifica uma parte da região codificadora da VP2-VP3. Eles determinaram as sequências nucleotídicas de 27 de seus produtos de PCR, evidenciando, dessa forma, a existência de variabilidade nessa região (Dos Santos et al., 2012). A tradução do segmento correspondente à VP3, deduzida a partir desses amplicons, demonstra que tal variação resulta também em variabilidade na composição de aminoácidos da proteína VP3 do AGV2.

## 2.5. Expressão de proteínas recombinantes

O campo da pesquisa requer que proteínas-alvo sejam expressas e/ou purificadas para que suas propriedades possam ser analisadas. Proteínas de interesse devem ser produzidas em larga escala para atender à necessidade

da indústria. Dessa forma, com o advento e progresso da engenharia genética, a demanda por proteínas recombinantes tem se elevado drasticamente nos últimos anos. Atualmente, a maioria dos biofármacos produzidos é recombinante (Demain; Vaishnav, 2009). Mais de 75 proteínas recombinantes já estão em uso como fármacos e outras centenas estão em desenvolvimento. Mesmo que muitas proteínas sejam produzidas rotineiramente em laboratórios de pesquisa ou em grandes quantidades pela indústria, a produção de proteínas recombinantes ainda é muitas vezes um desafio (Palomares; Estrada-Mondaca; Ramírez, 2004).

Para produzir uma proteína recombinante é necessário inicialmente selecionar o sistema de expressão adequado e então clonar o gene de interesse de forma que este possa ser transferido para e transcrito pelo sistema escolhido.

### **2.5.1. Sistemas de expressão**

Proteínas recombinantes podem ser expressas em culturas de bactérias, leveduras, fungos filamentosos, células de plantas, células de insetos, células de mamíferos ou até mesmo através de plantas ou animais transgênicos.

A bactéria *Escherichia coli* foi o primeiro organismo usado para a produção de proteínas recombinantes humanas, e ainda hoje é um dos sistemas de expressão mais utilizados (Terpe, 2006). O amplo conhecimento da biologia molecular e fisiologia deste organismo é uma das diversas vantagens desse sistema, que conta ainda com a facilidade de cultivo, o baixo

custo, crescimento e expressão rápida e alta produtividade (Baneyx, 1999). Porém, esse sistema é incapaz de promover modificações pós-traducionais, que muitas vezes são essenciais para a proteína; e dificilmente são produzidas proteínas com pontes dissulfeto por esse organismo. Além disso, proteínas heterólogas podem ser tóxicas para a bactéria levando-a a morte; ou podem ser expressas em corpos de inclusão, tornando-as inativas, insolúveis e necessitando de subseqüentes processos de desnaturação e renaturação (Demain; Vaishnav, 2009).

Leveduras são geralmente utilizadas para a expressão de proteínas recombinantes que não são adequadamente produzidas em *E. coli* principalmente por serem capazes de realizar muitas modificações pós-traducionais. Entretanto, a glicosilação promovida por leveduras é diferente da que ocorre em proteínas de mamíferos o que pode afetar a solubilidade, meia-vida e atividade da proteína, além de desencadear respostas imunes quando usadas em humanos ou animais (Demain; Vaishnav, 2009; Lisowska, 2002).

A capacidade de promover modificações pós-traducionais e secretar grandes quantidades de proteínas fazem dos fungos filamentosos interessantes sistemas de expressão. Todavia, a grande produção de proteases por esses organismos limita sua utilização para este fim (Palomares; Estrada-Mondaca; Ramírez, 2004).

Células de inseto são capazes de promover modificações pós-traducionais mais complexas e um enovelamento mais adequado em proteínas de mamíferos. Além disso, este sistema não é limitado pelo tamanho da

proteína e possibilita a expressão simultânea de múltiplos genes. Entretanto, é um processo mais lento e complexo do que a expressão em fungos ou bactérias. O vetor mais utilizado para a transferência gênica nessas células é o baculovírus (Demain; Vaishnav, 2009).

Células animais são frequentemente usadas para a expressão de proteínas que necessitam de modificações pós-traducionais. Mesmo que a complexidade dessas células tenha dificultado sua manipulação genética, atualmente a maioria das proteínas aprovadas para uso humano é produzida em células animais (Palomares; Estrada-Mondaca; Ramírez, 2004). Proteínas produzidas nesse sistema de expressão geralmente possuem conformação e modificações pós-traducionais adequadas. No entanto, o alto custo e a longa duração do processo (5 a 10 dias) são algumas desvantagens desse sistema (Demain; Vaishnav, 2009).

Proteínas recombinantes podem ser produzidas também em plantas transgênicas ou no leite, sangue, ovos ou urina de animais transgênicos. Cabras, camundongos, bovinos, suínos, coelhos e ovelhas transgênicos vêm sendo desenvolvidos, entretanto a principal desvantagem desse sistema de produção é o alto custo e o longo tempo de criação desses animais até a obtenção da produção. Já a produção em plantas, como a *Arabidopsis thaliana*, é mais simples, econômica e rápida (Demain; Vaishnav, 2009).

### **2.5.2. Sistemas de transferência gênica**

Para a expressão da proteína recombinante de interesse o gene codificador desta deve ser transferido para o sistema de expressão hospedeiro.

Os principais meios para realizar essa transferência gênica são: através de plasmídeos, por meio de integração ao genoma do hospedeiro ou entregue por um vírus.

Transformação com plasmídeo contendo o gene de interesse é o mecanismo de transferência mais comum quando procaríotos são usados como sistema de expressão. Sua popularidade deve-se principalmente a sua facilidade de manipulação genética, entretanto sua instabilidade no hospedeiro pode limitar a expressão da proteína recombinante. Como forma de superar este problema, o gene de interesse pode ser integrado ao genoma do sistema de expressão hospedeiro. Porém, esta é uma técnica bastante trabalhosa e demorada, além de normalmente resultar em menor produtividade (Palomares; Estrada-Mondaca; Ramírez, 2004).

Uma alternativa menos laboriosa e mais eficaz de realizar a transferência gênica é através do uso de vetores virais. Como parte de seu ciclo replicativo, os vírus podem transferir seu material genético para a célula hospedeira. Dessa forma, um gene de interesse inserido no genoma viral é conjuntamente transferido para o sistema de expressão hospedeiro.

Enquanto vetores retrovirais promovem a integração do genoma viral no genoma do hospedeiro, outros - como adenovírus, baculovírus e poxvírus - induzem uma expressão transitória da proteína de interesse. A expressão transitória mediada por vírus é uma técnica de produção de proteínas frequentemente usada em laboratórios de pesquisa com o intuito de realizar

testes preliminares com candidatos a fármacos (Palomares; Estrada-Mondaca; Ramírez, 2004).

O adenovírus humano é um dos sistemas de transferência gênica mais usados, principalmente devido ao vasto conhecimento de sua biologia. Além disso, adenovírus podem infectar uma ampla variedade de tipos celulares que se dividem ou estão quiescentes; permitem a inserção de grandes fragmentos de DNA em seu genoma; são relativamente fáceis de preparar; e altos títulos virais podem ser obtidos. Por questões de segurança, adenovírus deficientes em replicação são normalmente usados, os quais são capazes apenas de transduzir, mas não de se replicar em células humanas (Russell, 2000; Li et al., 2013).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Células e cultivo celular**

A linhagem de carcinoma pulmonar humano A549 foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Fábio Klamt (Departamento de Bioquímica, UFRGS) e cultivada em meio RPMI 1640 (Gibco). A linhagem de fibroblasto pulmonar humano MRC-5, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. João Antônio Pêgas Henriques (Centro de Biotecnologia, UFRGS), e a linhagem de células embrionárias renais humanas 293A foram cultivadas em meio DMEM com alta glicose (Gibco). Todas as células foram mantidas em meio suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB, Gibco), 50 U/ml de penicilina e 50 µg/ml de estreptomicina (Penicillin-Streptomycin, Gibco) e incubadas em atmosfera úmida a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **3.2. Amplificação do gene da VP3 por PCR**

Os três variantes do AGV2 mais frequentes detectados por Dos Santos e colaboradores (2012) – AGV2-T (número de acesso NCBI: HM590588), AGV2-SM e AGV2-N1 - foram selecionados para fazer parte desse trabalho. Plasmídeos pUC18 (New England Biolabs) contendo os genomas completos dos variantes AGV2-T e AGV2-SM, e uma amostra de DNA contendo o



variante AGV2-N1 foram submetidos à PCR para amplificar a região codificadora da proteína VP3.

Para a amplificação dos genes da VP3 dos variantes AGV2-T e AGV2-SM foi utilizado o seguinte par de oligonucleotídeos: PF1: 5'-GCCACCATGCAGACCCCCCGCTCTCG-3' e PR1: 5'-CAGTCTTAGTTTTTTTATGGGGGGTTC-3'. Esses amplificam um fragmento de 378 pb, correspondente à região codificadora da VP3, e introduzem a sequência de Kozak "GCCACC" (Kozak, 1987) a montante do códon de iniciação. Para a amplificação do gene da VP3 do variante AGV2-N1 foram usados os oligonucleotídeos PF2: 5'-GCCACCATGCAGACCCCCCGCTCTCA-3' e PR2: 5'-CACTCTTAGCCTTTTTTCGAATAGGG-3', que igualmente introduzem a sequência de Kozak e amplificam 381 pb referentes ao gene da VP3. Todos os primers foram desenhados com o programa Gene Link™ OligoExplorer 1.5.

A reação em cadeia da polimerase foi realizada com 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, tampão de PCR 1X, 5 pM de cada primer, 1,25 U *Taq* DNA Polimerase, 0,8 mM dNTP, 100 ng da amostra de DNA e água deionizada em um volume de 25 µl por reação.

As reações foram realizadas em um termociclador Mastercycler® personal (Eppendorf) programado nas seguintes condições: 94°C por 7 minutos seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 57°C e 30 segundos a 72°C, encerrando com 7 minutos a 72°C. Os produtos foram

visualizados após eletroforese em gel de agarose 1% e purificados usando o Illustra GFX™ PCR and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare).

### 3.3. Construção dos vetores de entrada

Os produtos de PCR obtidos (VP3-T, VP3-SM e VP3-N1) foram clonados no plasmídeo de entrada pCR8/GW/TOPO utilizando-se o pCR8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit (Invitrogen). As reações, contendo 2 µl do produto de PCR, 1 µl de solução salina (1,2M NaCl; 0,06M MgCl<sub>2</sub>), 1 µl do vetor pCR8/GW/TOPO e 2 µl de água deionizada, foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente. Bactérias *E. coli* competentes foram transformadas por choque térmico com os vetores obtidos (pCR8<VP3-T>, pCR8<VP3-SM> e pCR8<VP3-N1>), semeadas em meio LB contendo ágar 1,5 % e estreptomicina 100 µg/ml e incubadas *overnight* a 37°C. Diversas colônias foram inoculadas em meio LB líquido com estreptomicina e incubadas *overnight* a 37°C sob agitação constante. Em seguida, foi realizada a extração do DNA plasmidial por lise alcalina seguindo o protocolo padrão (Sambrook; Russell, 2001). Através da clivagem dos plasmídeos obtidos com *EcoRI* e *HincII* foi possível determinar a orientação dos insertos.

### 3.4. Análise das sequências de nucleotídeos e de aminoácidos

As sequências de nucleotídeos e a fase de leitura apropriada dos insertos foram confirmadas por sequenciamento utilizando o equipamento ABI-PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As análises das sequências de DNA e as deduções das sequências proteicas foram realizadas nos programas BioEdit 7.2 (Hall, 1999) e EditSeq DNASTAR Lasergene 7.0

(Burland, 2000). Os alinhamentos das sequências e a avaliação da diferença entre elas foram conduzidas no programa MegAlign DNASTAR Lasergene 7.0 (Burland, 2000). A busca por sequências de localização nuclear (NLS) foi realizada empregando-se o algoritmo SeqNLS (Lin; Hu, 2013). Os sítios de fosforilação foram preditos pelo algoritmo NetPhos 2.0 Server (Blom; Gammeltoft; Brunak, 1999). A procura por sinais de exportação nuclear (NES) foi feita através da busca de sequências coincidentes a alguma das sequências consenso propostas (la Cour et al., 2004; Kosugi et al., 2008; Güttler et al., 2010; Xu et al., 2012).

### **3.5. Construção dos vetores adenovirais recombinantes**

A construção dos vetores adenovirais recombinantes expressando as variantes VP3-T, VP3-SM e VP3-N1 foi feita através da reação de recombinação entre os vetores de entrada pCR8<VP3-T>, pCR8<VP3-SM> e pCR8<VP3-N1> com o vetor adenoviral pAd/CMV/V5-DEST™ Gateway® (Invitrogen) conforme instruções do fabricante. Resumidamente, 100 ng do vetor de entrada e 300 ng do vetor adenoviral foram incubados em tampão TE pH 8,0 na presença da enzima LR Clonase™ II por 20 horas à temperatura ambiente. Nesta reação o inserto presente no vetor de entrada passa para o vetor adenoviral através da recombinação enzimaticamente mediada dos sítios *attL1* e *attL2* existentes no primeiro com os sítios *attR1* e *attR2* do segundo. Após esse período, a atividade da Clonase foi inibida pela incubação da reação com Proteinase K, e 2 µl da reação de recombinação foi usado para transformar *E. coli* competentes por choque térmico. As bactérias foram

semeadas em meio LB sólido contendo 50 µg/ml de ampicilina e incubadas *overnight* a 37°C. Várias colônias foram inoculadas em meio LB líquido com ampicilina e incubadas *overnight* a 37°C sob agitação constante. Em seguida, foi realizada a extração do DNA plasmidial por lise alcalina. A correta sequência de nucleotídeos e a fase de leitura apropriada dos insertos foram confirmadas por sequenciamento.

### 3.6. Transfecção dos vetores adenovirais recombinantes

Os vetores adenovirais recombinantes expressando as variantes da VP3 (pAd<VP3-T>, pAd<VP3-SM> e pAd<VP3-N1>) e o vetor adenoviral controle pAd<LacZ> expressando o gene *lacZ* (fornecido no ViraPower™ Adenoviral Expression System, Invitrogen) foram clivados com a enzima de restrição *PacI* para remover as sequências bacterianas do plasmídeo e expor as repetições terminais invertidas (ITRs) do adenovírus. Posteriormente, foram purificados utilizando-se fenol/clorofórmio seguido por precipitação com isopropanol.

No dia anterior à transfecção, foram plaqueadas  $5 \times 10^5$  células 293A por poço em uma placa de 6 poços com meio contendo SFB e antibióticos. No dia seguinte, o meio foi substituído por meio sem antibióticos. Um micrograma do vetor adenoviral previamente clivado com *PacI* e diluído em 250 µl de meio Opti-MEM® I sem soro foi combinado com 3 µl de Lipofectamina™ 2000 também já diluída em 250 µl de meio Opti-MEM® I sem soro e a reação foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente permitindo a formação dos complexos DNA-Lipofectamina. Em seguida, os complexos foram gotejados

nos poços e o cultivo celular foi incubado *overnight* a 37°C. No dia seguinte, o meio foi substituído por DMEM alta glicose com SFB e antibióticos. Dois dias após a transfecção, as células de cada poço foram tripsinizadas e transferidas para garrafas de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup>. As células foram mantidas em cultivo até que o efeito citopático chegasse a 80 % (aproximadamente 15 dias), quando então, as culturas foram congeladas e mantidas a -80°C.

### **3.7. Amplificação do estoque viral**

Os adenovírus recombinantes (Ad<VP3-T>, Ad<VP3-SM> e Ad<VP3-N1>) foram sucessivamente inoculados nas células 293A para amplificar seus títulos. Em cada passagem, 800 µl da passagem viral anterior foram inoculados em uma monocamada pré-formada de células 293A, as quais foram mantidas por 1 hora a 37°C sob agitação. Logo após, o inóculo foi removido e foi adicionado meio de cultivo. As células foram mantidas em cultivo até que o efeito citopático chegasse a 80%, quando as culturas foram congeladas e mantidas a -80°C.

### **3.8. RT-PCR**

Amostras dos cultivos celulares infectados com os adenovírus recombinantes foram submetidas à extração de RNA total com fenol-isotiocianato de guanidina e clorofórmio (Chomczynski; Sacchi, 1987). Em seguida, foi realizada a síntese do cDNA utilizando-se primers oligo-dT e a transcriptase reversa do vírus da leucemia murina de Moloney (M-MuLV RT, New England Biolabs). Para isso, 10 µl do RNA extraído foi incubado com 5 µM de primers oligo-dT e 1,25 mM de dNTP em um volume final de 16 µl por 5

minutos a 65°C. Após a adição às reações de tampão da RT 1 X, 200 U da transcriptase reversa e água deionizada tratada com DEPC foram adicionados para completar o volume final de 20 µl, essas foram incubadas por 1 hora a 42°C e a enzima inativada a 90°C por 10 minutos. As amostras foram então, submetidas às PCRs específicas para os genes das VP3-T, VP3-SM e VP3-N1 nas condições e com os oligonucleotídeos já descritos anteriormente. O resultado foi visualizado em gel de agarose 1 %.

### 3.9. Imunofluorescência

As células foram cultivadas em placas de cultivo celular com fundo de vidro e transduzidas com os adenovírus recombinantes com uma MOI de 30. Após incubação de 24 horas, o cultivo celular foi lavado com PBS, fixado com paraformaldeído a 4% por 30 minutos e permeabilizado com Triton X-100 1% por 20 minutos a temperatura ambiente. O bloqueio de reações inespecíficas foi feito por incubação com BSA a 3% em PBS-T (0,05% de Tween 20 em PBS) por 30 minutos, e em seguida o cultivo foi incubado com o anticorpo primário anti-V5 Tag (1:500, Pierce Antibodies) *overnight* a 4°C. A seguir, as células foram lavadas três vezes com PBS-T e incubadas com o anticorpo secundário de cabra anti-imunoglobulina de camundongo conjugado com fluoresceína (1:50, BD Pharmingen) por 1 hora a temperatura ambiente. Os núcleos celulares foram marcados com Hoechst 33342 (2 µg/ml) por 15 minutos. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS-T e, então, as placas de cultivo foram montadas usando-se PBS:Glicerina (1:1) e

analisadas no microscópio confocal de fluorescência Olympus FluoView™1000.

### 3.10. Teste de viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pelo método colorimétrico de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio (MTT; Sigma-Aldrich). Esta técnica determina a atividade mitocondrial, a qual é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis existentes no cultivo. As células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de  $3,5 \times 10^4$  células por poço. No dia seguinte, as células foram transduzidas com os adenovírus recombinantes em diferentes concentrações (MOI = 0,1; 1; 10 e 50) ou somente com PBS (grupo controle) e incubadas por 3 dias. Poços contendo apenas meio de cultivo foram incluídos para fornecer os brancos da absorbância. Em seguida, 50  $\mu$ l de MTT (1 mg/ml) foram adicionados em cada poço. Após 4 horas de incubação a 37°C, os cristais de formazan formados pelo metabolismo celular foram ressuspensos em 150  $\mu$ l de isopropanol contendo 30 mM de HCl. As placas foram lidas em leitor de microplacas a 570 nm e 630 nm (Biochrom® Anthos Zenyth 200rt). A viabilidade celular foi calculada pela seguinte fórmula (onde A se refere à média das absorbâncias da diferença entre a leitura a 570 nm e 630 nm):  $1 - \frac{(A_{\text{células controle}} - A_{\text{células tratadas}})}{(A_{\text{células controle}} - A_{\text{branco}})}$ . Todos os testes foram realizados em triplicata, em quatro experimentos paralelos.

### 3.11. Análise Estatística

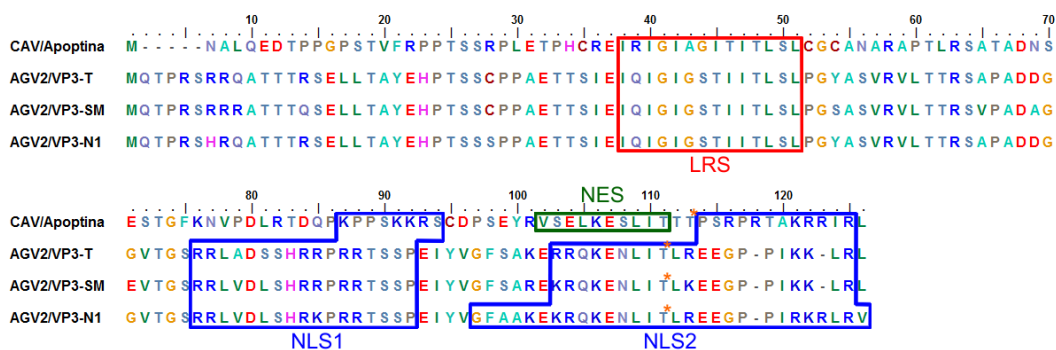
Os resultados das replicatas foram submetidos as teste de Grubbs e os valores significativamente discrepantes ( $\alpha=0,05$ ) foram excluídos do cálculo das médias. Os dados são apresentados como média (e desvio padrão). Nas análises estatísticas foi usado o teste *t* de Student bicaudal não-pareado.  $P<0,05$  foi considerado como indicador de resultado estatisticamente significativo. O desenho dos gráficos e todas as análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 5.03.







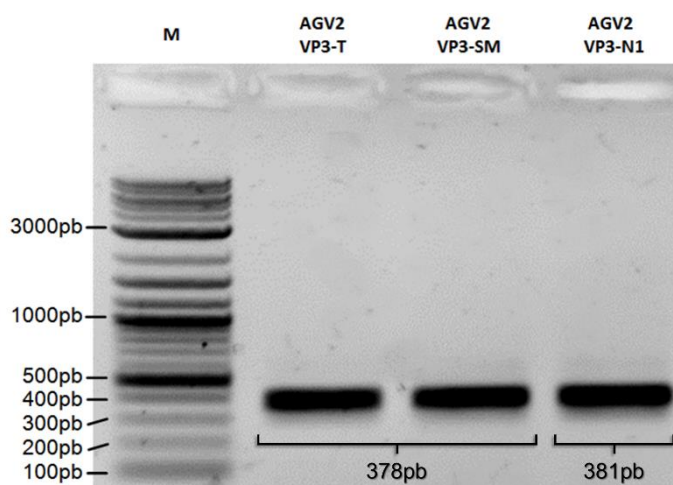
a região hidrofóbica rica em leucina (LRS; resíduos 33-46), a sequência de localização nuclear (NLS) bipartida (resíduos 82-88 e 111-121), o sinal de exportação nuclear (NES; resíduos 97-105), e ainda o sítio de fosforilação presente na Threonina-108. Na Figura 17 pode-se conferir a presença do domínio LRS altamente conservado em todas as VP3 do AGV2 nos resíduos 38-51. O algoritmo SeqNLS identificou corretamente o NLS bipartido da Apoptina do CAV e encontrou esse domínio nas três VP3 do AGV2. Em todas as VP3, a primeira parte (NLS1) do domínio foi encontrada entre os resíduos 76-92. Já a segunda parte (NLS2) foi encontrada nos resíduos 103-123 nas VP3-T e VP3-SM e nos resíduos 97-125 na VP3-N1. Um sítio de fosforilação foi encontrado em todas as VP3 do AGV2 na Threonina-111 (Figura 17). Por outro lado, o domínio NES não foi encontrado em qualquer uma das VP3 do AGV2 analisadas. Enquanto o NES da Apoptina do CAV corresponde perfeitamente à sequência consenso proposta por Kosugi e colaboradores (2008), as VP3 do AGV2 não apresentam sequência condizente com qualquer dos consensos já propostos para NES.



**Figura 17** - Alinhamento das sequências de aminoácidos da Apoptina do CAV e das VP3 dos variantes AGV2-T, AGV2-SM e AGV2-N1. Os quadros delimitam os domínios LRS (vermelho), NLS (azul) e NES (verde). Os sítios de fosforilação preditos estão indicados por asteriscos.

## 4.2. Amplificação do gene da VP3 por PCR

A fim de se obter os genes a serem expressos no sistema adenoviral de expressão, as regiões codificadoras da VP3 dos variantes AGV2-T, AGV2-SM e AGV2-N1 previamente sequenciadas foram amplificadas por PCR. A amplificação do gene da VP3 a partir das amostras contendo o genoma dos variantes AGV2-T e AGV2-SM produziu produtos de PCR de tamanho esperado de 378 pb, os quais foram confirmados por sequenciamento. A amplificação da VP3 da amostra de DNA do AGV2-N1 gerou um fragmento de 381 pb, também confirmado por sequenciamento (Figura 18).



**Figura 18** - Análise das PCRs em gel de agarose a 1%. Visualização das bandas referentes à amplificação das variantes VP3-T, VP3-SM e VP3-N1. M: 2-Log DNA Ladder (New England Biolabs).

## 4.3. Construção dos vetores adenovirais recombinantes

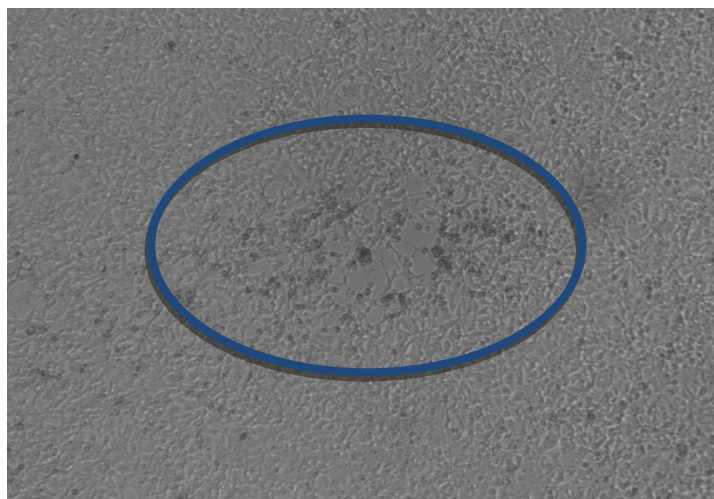
O primeiro passo para a construção dos vetores adenovirais recombinantes expressando as VP3 dos variantes do AGV2 foi a clonagem dos

produtos de PCR (VP3-T, VP3-SM e VP3-N1) no vetor de entrada pCR8/GW/TOPO. O que resultou na obtenção de 12 clones contendo a VP3-T, 12 clones com a VP3-SM e 10 clones contendo a VP3-N1. A clivagem desses plasmídeos com *EcoRI* e *HincII* permitiu a identificação de 14 clones na orientação correta, sendo 4 contendo a VP3-T, 6 contendo a VP3-SM e 4 com a VP3-N1. O sequenciamento destes clones confirmou que os insertos contêm a sequência correta e estão na fase de leitura apropriada. Dessa forma, os vetores de entrada pCR8<VP3-T>, pCR8<VP3-SM> e pCR8<VP3-N1> foram obtidos.

Os três vetores de entrada construídos foram recombinados enzimaticamente com o vetor adenoviral numa reação que promove a passagem dos insertos presentes nos vetores de entrada para o vetor adenoviral. Os produtos dessas reações foram usados na transformação de bactérias competentes, após a qual foram obtidos 3 clones a partir de cada uma das reações. A presença dos insertos foi confirmada inicialmente por PCR. Em seguida, o sequenciamento dos vetores confirmou a correta sequência de nucleotídeos e a apropriada fase de leitura dos insertos em relação ao restante do vetor. Assim, os vetores adenovirais recombinantes expressando variantes da VP3 do AGV2 - pAd<VP3-T>, pAd<VP3-SM> e pAd<VP3-N1> - foram obtidos.

#### 4.4. Geração dos adenovírus recombinantes

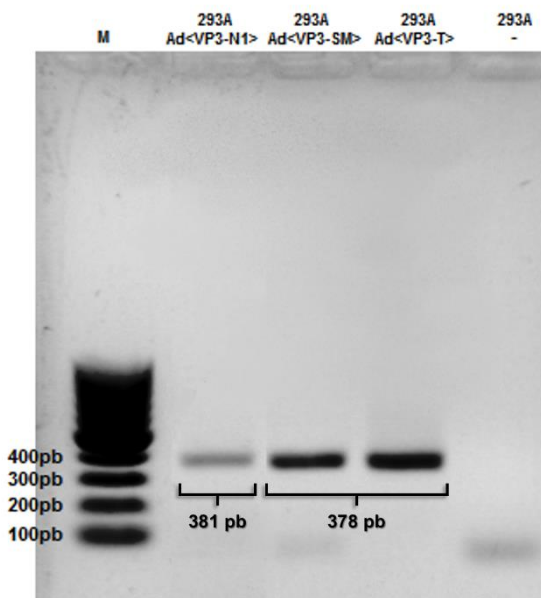
Para se obter os adenovírus recombinantes expressando as variantes da VP3 do AGV2, os vetores adenovirais construídos e o vetor adenoviral controle pAd<LacZ>, após serem clivados com a enzima *PacI* e purificados, foram transfectados em células 293A. A replicação dos adenovírus recombinantes expressando as variantes da VP3 do AGV2 foi detectada através da visualização do efeito citopático característico nas monocamadas celulares aproximadamente 10 dias depois da transfecção (Figura 19). No momento em que o efeito citopático alcançou cerca de 80% das células, o cultivo foi congelado. Ao fim de seis inoculações sucessivas em células 293A os títulos dos adenovírus obtidos alcançaram pelo menos  $10^8$  PFU/ml.



**Figura 19** – Efeito citopático adenoviral em células 293A - característico pelo arredondamento e lise das células formando evidentes placas virais - dez dias após a transfecção do vetor adenoviral recombinante pAd<VP3-SM>. Efeitos similares foram obtidos na transfecção dos demais vetores.

#### 4.5. Confirmação da síntese de RNAs mensageiros das VP3

A confirmação da efetiva transcrição dos genes das VP3 nesse sistema de expressão foi feita por meio da técnica de RT-PCR. A amplificação do gene da VP3 a partir das amostras de RNA obtidas dos cultivos celulares infectados separadamente com os adenovírus Ad<VP3-T>, Ad<VP3-SM> e Ad<VP3-N1> originou produtos de PCR do tamanho esperado de 378 pb, nos dois primeiros casos, e de 381 pb no último caso, os quais foram verificados por sequenciamento. Como esperado, não foi detectada a amplificação da VP3 a partir do RNA extraído do cultivo celular não infectado (Figura 20). Dessa forma, a síntese dos respectivos RNAs mensageiros (RNAm) recombinantes foi confirmada para todos os adenovírus construídos.



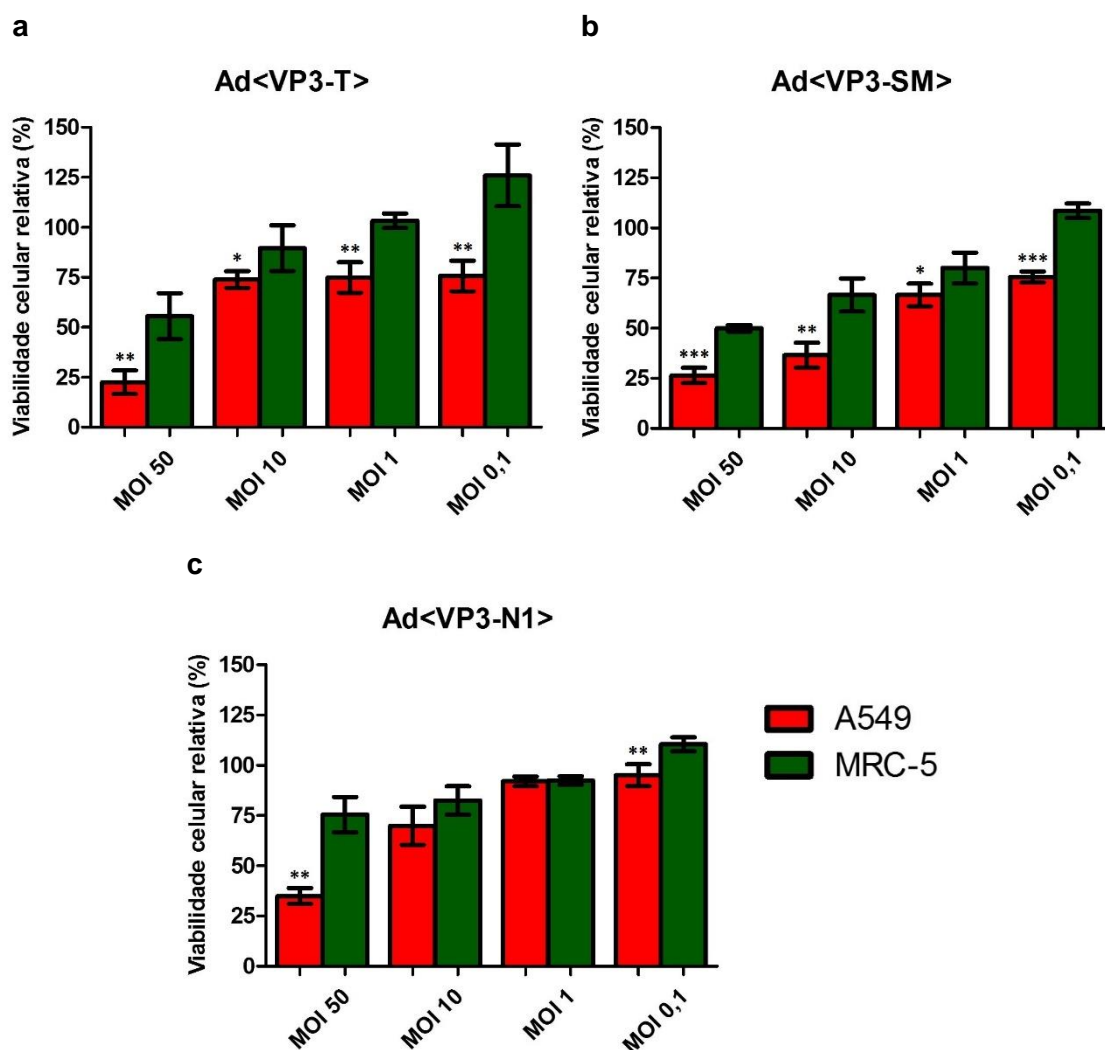
**Figura 20** - Análise das RT-PCRs em gel de agarose a 1%. A visualização das bandas eferentes à amplificação das variantes VP3-T, VP3-SM e VP3-N1 confirmam a transcrição dos respectivos RNAm pelo sistema construído. M: 100bp DNA Ladder (New England Biolabs).

#### **4.6. Inibição da proliferação celular pelos Ad<VP3-T>, Ad<VP3-SM> e Ad<VP3N1>**

Para avaliar se os adenovírus expressando as VP3 do AGV2 possuem a capacidade de induzir seletivamente a morte das células tumorais, os adenovírus recombinantes foram transduzidos nas linhagens celulares A549 e MRC-5 e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT.

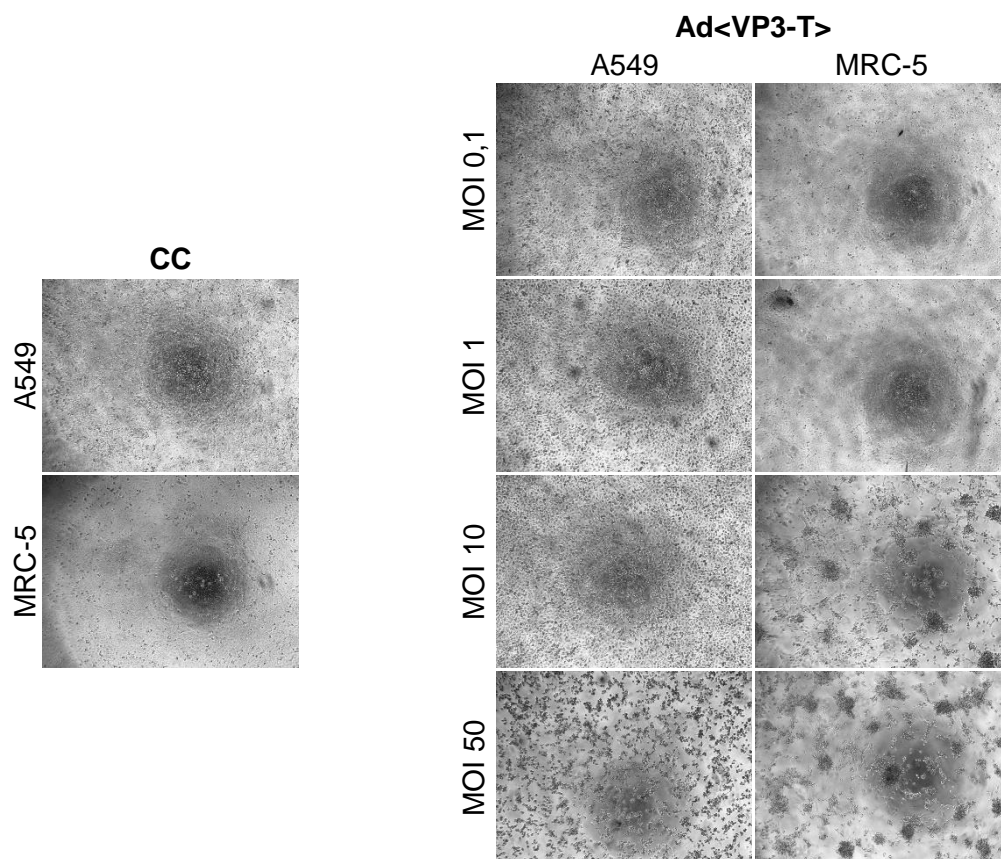
Como pode-se observar na Figura 21 e Figura 22, os três adenovírus expressando as diferentes VP3 do AGV2 inibem o crescimento das células tumorais A549 de forma dose-dependente. O mesmo se percebe nas células normais MRC-5, porém nessas células a inibição do crescimento é significativamente inferior ao detectado nas células A549 submetidas ao mesmo tratamento ( $p < 0,05$ ). Duas exceções a essa observação ocorrem nas células transduzidas com o Ad<VP3-N1> com MOI 1 e MOI 10, em que o efeito na viabilidade celular não difere em ambas células.





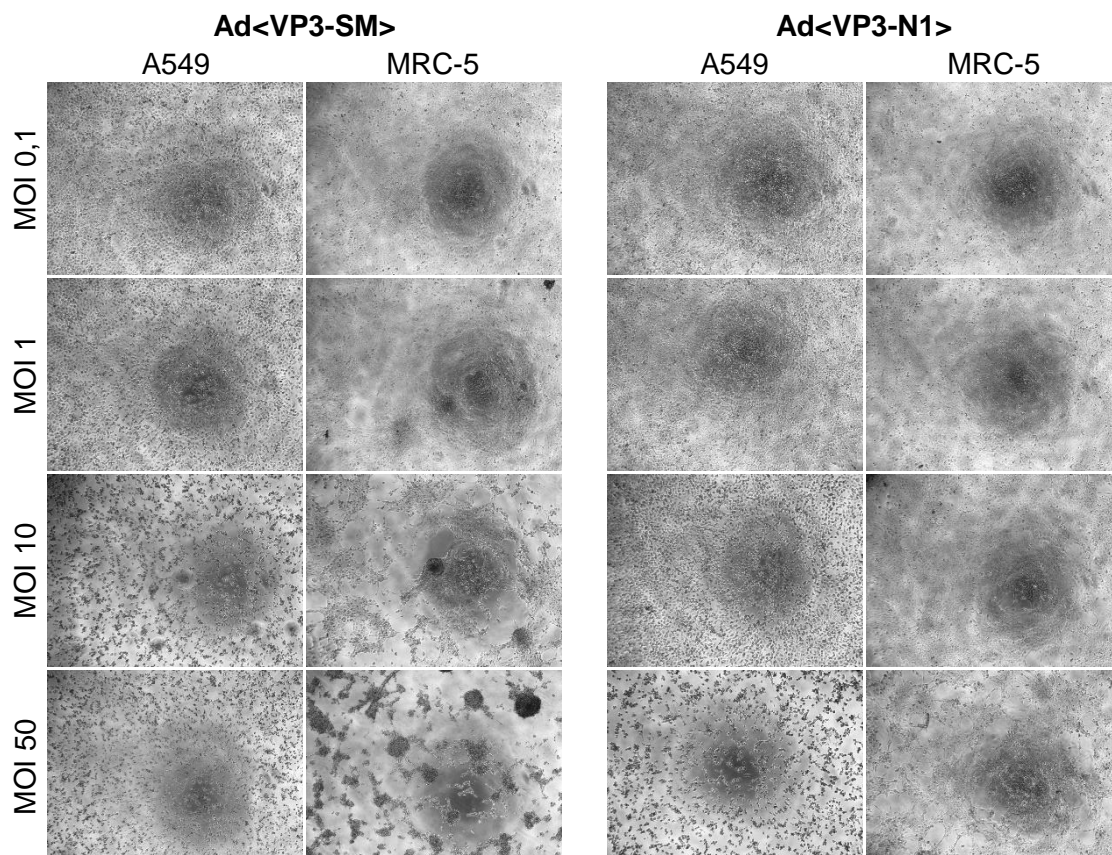
**Figura 21** – Teste de viabilidade celular após a transdução com os adenovírus expressando as diferentes VP3 do AGV2. Células tumorais A549 e normais MRC-5 foram transduzidas com (a) Ad<VP3-T>, (b) Ad<VP3-SM> e (c) Ad<VP3-N1> em diferentes MOIs (0,1; 1; 10; 50). Após 72 horas, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. Resultados apresentados como médias e desvio padrão (barras de erro) de quatro experimentos. Teste *t* de Student: \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,0001$ .

Analisando-se os resultados, observa-se que as células MRC-5 apresentam-se em média 25% mais viáveis do que as células A549 após a transdução com os adenovírus expressando as VP3 do AGV2.



**Figura 22** – Fotografias representativas das células MRC-5 e A549 72 horas após a transdução com os adenovírus recombinantes expressando as diferentes VP3 do AGV2 com as MOIs indicadas. Acima, controle celular (CC). Imagens adquiridas em microscópio óptico invertido. Magnificação: 40X.

## Continuação da Figura 22

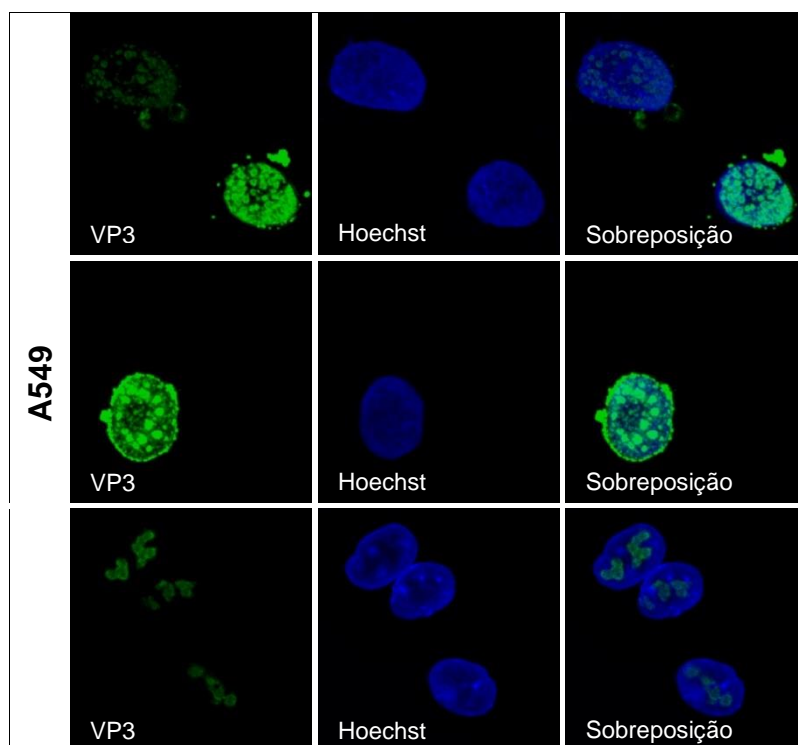


#### 4.7. Localização subcelular

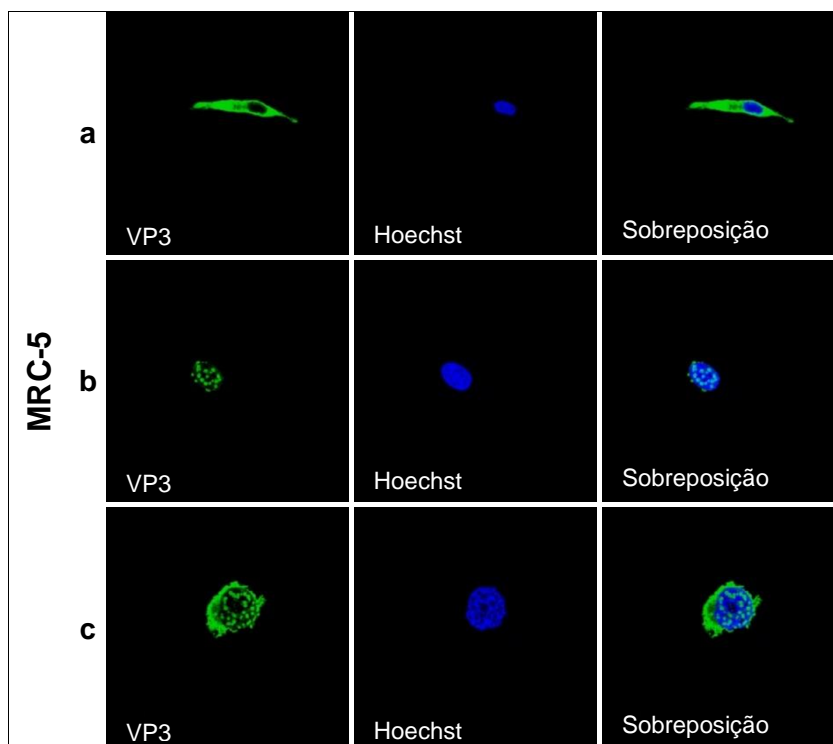
A indução da apoptose iniciada pela Apoptina do CAV parece estar associada com a localização subcelular diferencial que ela assume nas células. Nas células humanas normais a Apoptina localiza-se principalmente no citoplasma, enquanto que se acumula no núcleo das células humanas tumorais (Danen-van Oorschot et al., 1997). A fim de verificar a distribuição subcelular das VP3 do AGV2 nas células humanas normais e tumorais, as células A549 e MRC-5 foram transduzidas com os adenovírus recombinantes expressando as diferentes variantes da VP3 do AGV2 e analisadas por imunofluorescência.

As três variantes da VP3 do AGV2 apresentaram o mesmo padrão de distribuição subcelular nas células analisadas. As mesmas foram encontradas sobretudo acumuladas no núcleo das células tumorais A549 (Figura 23). Já nas células normais MRC-5, as VP3 do AGV2 foram detectadas principalmente restritas ao citoplasma (Figura 24a), no entanto também puderam ser detectadas, em menor grau, acumuladas no núcleo (Figura 24b) ou encontradas simultaneamente em ambos locais (Figura 24c).

Outra interessante observação que se pôde verificar através desse experimento é que todas as variantes da VP3 do AGV2 quando localizadas no núcleo celular formam grandes estruturas granulares (Figura 23 e Figura 24).



**Figura 23** – Imagens representativas da localização nuclear da VP3 do AGV2 nas células humanas tumorais A549. VP3 marcada com anticorpo conjugado com fluoresceína e núcleo corado com Hoechst. Visualização em microscópio confocal de fluorescência. Aumento de 600X.



**Figura 24** - Imagens representativas da localização subcelular da VP3 do AGV2 nas células humanas normais MRC-5. Essas proteínas foram detectadas principalmente restritas ao citoplasma (a), mas também puderam ser observadas, em menor proporção, acumuladas no núcleo (b), ou presentes concomitantemente em ambos locais (c). VP3 marcada com anticorpo conjugado com fluoresceína e núcleo corado com Hoechst. Visualização em microscópio confocal de fluorescência. Aumento de 600X.

## 5. DISCUSSÃO

Desde o final da década de 1990, quando foi noticiado pela primeira vez que a Apoptina expressa pelo CAV é capaz de induzir apoptose em células humanas tumorais, enquanto não tem qualquer efeito sobre células normais, seu potencial como droga antitumoral vem sendo extensamente avaliado (Danen-Van Oorschot et al., 1997; Backendorf et al., 2008). Os efeitos da Apoptina já foram analisados em mais de 70 linhagens de células humanas tumorais e outras dezenas de células humanas normais (Backendorf et al., 2008). A Apoptina já foi expressa utilizando diversos sistemas de expressão, como por exemplo, em *E. coli* (Sun et al. 2009; Jin et al. 2011; Lee et al., 2011; Li et al., 2012), em células de mosquito através de baculovírus (Pan et al., 2010) e em células de mamíferos usando vetores plasmidiais (Zhan et al. 2012; Yang et al., 2012; Lanz et al., 2012; An et al., 2013) ou adenovírus (van der Eb et al., 2002; Kucharski et al., 2011; Zhang et al., 2012; Taebunpakul et al., 2012; Wang et al., 2013).

Recentemente foi identificado por nosso grupo o girovírus aviário 2 (AGV2), o qual apresenta um estrutura e organização genômica muito similar ao CAV. Este vírus codifica a proteína VP3, homóloga à Apoptina do CAV (Rijsewijk et al. 2011).

Neste trabalho nós investigamos o potencial de três variantes da proteína VP3 do AGV2 em induzir a morte de células humanas normais e tumorais *in vitro*. Para este fim, foram construídos adenovírus recombinantes expressando as variantes da VP3. Os genes das VP3 foram inseridos no genoma adenoviral sob o controle do promotor dos genes precoces do citomegalovírus humano (CMV) e fusionados ao epítipo C-terminal V5, o que favorece um alto nível de expressão de forma constitutiva e possibilita a posterior detecção das proteínas por anticorpos.

Os testes de viabilidade celular demonstraram que os adenovírus recombinantes expressando as três variantes da VP3 do AGV2 são capazes de inibir a proliferação das células humanas tumorais A549 de maneira significativamente mais acentuada do que o verificado nas células humanas normais MRC-5. Comparando-se os efeitos citotóxicos causados pelos três adenovírus expressando as VP3 do AGV2, verifica-se que o Ad<VP3-SM> tende a ser o mais eficiente em inibir a proliferação das células tumorais, no entanto o mesmo é o que apresenta o efeito citotóxico mais acentuado também nas células normais. O Ad<VP3-N1>, quando transduzido na MOI 50 apresenta uma habilidade de inibir a proliferação das células tumorais significativamente maior do que o observado nas células normais, porém quando MOIs mais baixas são utilizadas essa seletividade não é mais verificada (na MOI 0,1 existe uma diferença significativa, no entanto em ambas células a viabilidade celular está próxima de 100%). Por fim, o Ad<VP3-T> inibiu significativamente a proliferação das células tumorais em todas as MOIs avaliadas e, além disso, a toxicidade sobre as células normais foi menos proeminente do que a

apresentada pelo Ad<VP3-SM>. Sendo assim, baseado nesse primeiro resultado, a VP3-T se apresenta como a variante mais promissora como agente capaz de inibir preferencialmente a proliferação de células tumorais.

Verificamos que os três vetores adenovirais expressando as variantes de VP3 do AGV2 inibem a proliferação das células tumorais A549 de forma dose-dependente. Resultados semelhantes, em que se verifica que a utilização de concentrações crescentes da Apoptina do CAV purificada ou de MOIs crescentes de vetores virais expressando essa proteína levam à inibição da proliferação das células tumorais de maneira dose-dependente foram anteriormente relatados (Pan et al., 2010; Li et al., 2010; Jin et al., 2011; Liu et al., 2012; Li et al., 2012). No entanto, neste trabalho, a proliferação das células normais MRC-5 também foi diminuída de forma dose-dependente após transdução com os três adenovírus recombinantes, mesmo que numa taxa significativamente mais baixa. Esse resultado contrasta com estudos anteriores realizados com a Apoptina do CAV, nos quais não se verifica esse efeito em células humanas normais (Li et al., 2010; Jin et al., 2011; Liu et al., 2012). Sendo assim, diferentemente da Apoptina do CAV, a VP3 do AGV2 parece induzir algum grau de morte celular nas células normais mesmo que significativamente mais baixo do que o induzido nas células tumorais.

A maneira pela qual a Apoptina do CAV é capaz de distinguir as células tumorais das normais ainda não está inteiramente esclarecida, mas diversos estudos demonstram que este evento está correlacionado com a sua retenção no núcleo das células tumorais e a sua manutenção no citoplasma das células



normais (Danen-van Oorschot et al., 2003; Maddika et al., 2006; Los et al., 2009). Em nosso trabalho, detectamos a compartimentalização das variantes da VP3 do AGV2 no núcleo das células tumorais, enquanto que, em células normais observamos a expressão dessa proteína principalmente restrita ao citoplasma celular. No entanto, vale ressaltar que, diferente do tradicionalmente descrito para a Apoptina do CAV, detectamos, mesmo que em menor proporção, a expressão de VP3 do AGV2 no núcleo, bem como localizadas simultaneamente no núcleo e no citoplasma das células normais. Como o acúmulo da VP3 no núcleo celular está muito provavelmente associado com a indução da morte celular, esse resultado poderia explicar por que a proliferação das células MRC-5 também é afetada por essas proteínas.

Interessantemente, os resultados de imunofluorescência nos permitiu observar que a VP3 do AGV2 se distribui, assim como a Apoptina do CAV (Leliveld et al., 2003; Janssen et al., 2007), em estruturas granulares dentro do núcleo das células. Essa organização granular da Apoptina do CAV parece estar relacionada a sua auto-agregação em multímeros (Leliveld et al., 2003) e a sua associação com a proteína da leucemia promielocítica (PML) - a qual se acumula no corpos PML (também conhecido como domínio nuclear 10) e está envolvida na indução da apoptose (Heilman; Teodoro; Green, 2006; Janssen et al., 2007). Todavia, estudos futuros de associação e de colocalização da VP3 do AGV2 com os corpos PML devem ser realizados para validar esta observação.

Os mecanismos moleculares que determinam a localização citoplasmática da Apoptina do CAV nas células humanas normais e seu acúmulo no núcleo das células humanas tumorais não estão satisfatoriamente elucidados, porém a presença de domínios de transporte núcleo-citoplasmático presentes nesta proteína parecem ser essenciais para que isso ocorra (Danenvan Oorschot et al., 2003; Maddika et al., 2006; Los et al., 2009). A sequência de localização nuclear (NLS) bipartida encontrada na extremidade C-terminal da Apoptina (resíduos 82-88 e 111-121) induz o seu transporte para o núcleo das células. Entre as duas partes do NLS localiza-se o sinal de exportação nuclear (NES; resíduos 97-105), o qual favorece o transporte da Apoptina do núcleo para o citoplasma, onde é processada pelos proteossomos. Dessa forma, a Apoptina é degradada no citoplasma das células normais, enquanto que nas células tumorais o NES é mascarado, provavelmente devido à fosforilação da Treonina-108, e a Apoptina não pode mais ser transportada de volta para o citoplasma, ficando retida no núcleo e deflagrando a apoptose (Poon et al., 2005; Maddika et al., 2006). Através da análise das sequências de aminoácidos das VP3 do AGV2 pudemos verificar a presença dos domínios LRS, NLS e do potencial sítio de fosforilação na treonina-111 em todas as variantes, porém em nenhuma delas foi possível encontrar o domínio NES.

O fato de não ter sido localizado o domínio NES nas VP3 do AGV2 não deve ser tomado como indício definitivo de sua ausência, uma vez que a predição desse domínio é feita através da busca por padrões de sequência de aminoácidos baseados em bancos de dados que possuem relativamente poucos NES identificados experimentalmente. Além disso, como o NES é um

sinal complexo e muito diverso, nenhuma das sequências consenso propostas até hoje é capaz de alcançar uma boa sensibilidade (la Cour et al., 2004; Xu et al., 2012). Analisando visualmente as sequências de aminoácidos das diferentes VP3 de CAV e AGV2, na região correspondente ao NES, nota-se que entre os aminoácidos 102 a 105, a similaridade é baixa, enquanto que há uma evidente identidade entre os aminoácidos 106-111 (Figura 17). Talvez essa região no AGV2 possa potencialmente funcionar como um sinal de exportação nuclear, porém sua eficiência de transporte possivelmente é diferente do NES da Apoptina do CAV, considerando-se as diferenças observadas nas sequências. Poon e colaboradores (2005) demonstraram que mutações no NES da Apoptina do CAV levam a um significativo aumento no acúmulo dessa proteína no núcleo de células normais. Sendo assim, pode-se especular que o NES supostamente existente na VP3 do AGV2 apresenta uma menor eficiência em sinalizar sua exportação para o citoplasma, fazendo com que a proteína acabe eventualmente se acumulando no núcleo das células normais, levando-as à morte. Essa hipótese poderia explicar a localização nuclear das VP3 do AGV2 observada em uma parcela das células normais e também a inibição da proliferação dessas células. Porém, não pode ser descartada a possibilidade de que o modelo de células normais utilizado nesse estudo, a linhagem MRC-5, apresente alguma singularidade que faça com que ela apresente alguma suscetibilidade aos efeitos da VP3 não compartilhada por outras linhagens celulares normais. Sendo assim, a condução de novos estudos avaliando os efeitos das VP3 do AGV2 em outros tipos celulares

seriam bastante interessantes e poderiam contribuir muito para aprofundarmos o conhecimento sobre o efeito dessa proteína em células normais.

Os resultados aqui apresentados indicam que os adenovírus construídos expressando as variantes da VP3 do AGV2 possuem a habilidade de inibir preferencialmente a proliferação de células tumorais. Para a confirmação desses resultados, e para conhecer o mecanismo utilizado por essas proteínas para causar morte celular, novos experimentos devem ser realizados utilizando-se um controle negativo de adenovírus que não expresse nenhuma forma da VP3 (pAd<LacZ>). Esse controle será utilizado, em paralelo com os outros adenovírus recombinantes, para verificar se a VP3 do AGV2, assim como a Apoptina do CAV, induz apoptose preferencialmente em células tumorais e, caso positivo, se as diferentes variantes atuam com eficácias semelhantes ou não. Essa confirmação será obtida após nova transdução dos adenovírus recombinantes em células normais e tumorais, seguida da detecção de células apoptóticas pelo ensaio de citometria de fluxo.

## 6. CONCLUSÕES

Este é o primeiro trabalho realizado sobre a proteína VP3 codificada pelo girovírus aviário 2. Neste estudo buscamos avaliar a habilidade da proteína VP3 do AGV2 em induzir seletivamente a morte de células humanas tumorais, como forma de julgar seu potencial como um possível novo agente antineoplásico.

Três diferentes variantes da VP3 do AGV2 foram expressas em sistema adenoviral recombinante. Os adenovírus recombinantes expressando as VP3 do AGV2 foram transduzidos em células humanas normais MRC-5 e tumorais A549. Pudemos verificar que eles foram capazes de inibir preferencialmente a proliferação das células humanas tumorais A549. Verificamos também que todas as VP3 do AGV2 acumulam-se no núcleo das células tumorais, enquanto que na maior parte das células normais essas proteínas ficam restritas ao citoplasma. No entanto, inesperadamente detectamos, em menor proporção, as VP3 do AGV2 presentes também no núcleo das células normais. Neste estudo ainda analisamos as sequências de aminoácidos das variantes da VP3 do AGV2 e pudemos propor correlações entre os domínios presentes nessas proteínas e os resultados obtidos.

## 7. REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. et al. Cancer. In: \_\_\_\_\_. **Molecular Biology of the Cell**. 5. ed. New York: Garland Science. Cap. 20, p. 1205-1268. 2007.

AN, S. et al. Nonviral gene therapy in vivo with PAM-RG4/apoptin as a potential brain tumor therapeutic. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 821-834, 2013.

BACKENDORF, C. et al. Apoptin: therapeutic potential of and early sensor of carcinogenic transformation. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 48, p. 143-169, 2008.

BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, p. 411-421, 1999.

BLOM, N.; GAMMELTOFT, S.; BRUNAK, S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. **Journal of Molecular Biology**, v. 294(5), p. 1351-1362, 1999.

BUREK, M. et al. Apoptin-induced cell death is modulated by Bcl-2 family members and is Apaf-1 dependent. **Oncogene**, v. 25, p. 2213-2222, 2006.

BURLAND, T. G. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. **Methods in Molecular Biology**, v.132, p. 71-91, 2000.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 162(1), p. 156-159, 1987.

DANEN-VAN OORSCHOT, A. A. A. M. et al. BAG-1 inhibits p53-induced but not apoptin-induced apoptosis. **Apoptosis**, v. 2(4), p. 395-402, 1997.

DANEN-VAN OORSCHOT, A. A. A. M. et al. Importance of nuclear localization of apoptin for tumor-specific induction of apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 27729-27736, 2003.

DANEN-VAN OORSCHOT, A. A. A. M.; VAN DER EB, A. J.; NOTEBORN, M. H. M. Bcl-2 stimulates Apoptin®-induced apoptosis. **Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma**, v. 457, p. 245-249, 1999.

DANEN-VAN OORSCHOT, A. A. A. M.; VAN DER EB, A. J.; NOTEBORN, M. H. M. The chicken anemia virus-derived protein Apoptin requires activation of caspases for induction of apoptosis in human tumor cells. **Journal of Virology**, v. 74(15), p. 7072-7078, 2000.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 297-306, 2009.

DING, Q. et al. The nucleocytoplasmic transport of viral proteins. **Virologica Sinica**, v. 25 (2), p. 79-85, 2010.

DOS SANTOS, H. F. et al. Variants of the recently discovered avian gyrovirus 2 are detected in Southern Brazil and The Netherlands. **Veterinary Microbiology**, v. 155, p. 230-236, 2012.

DU, C. et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. **Cell**, v. 102, p. 33–42, 2000.

EARNSHAW W. C. Nuclear changes in apoptosis. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 7, p. 337-343, 1995.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v.35, p. 495-516, 2005.

ESPOSTI, M. D. The roles of Bid. **Apoptosis**, v. 7, p. 433-440, 2002.

FADOK, V. A. et al. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 1071–1077, 2001.

FANG, X. et al. Combination of apoptin with photodynamic therapy induces nasopharyngeal carcinoma cell death *in vitro* and *in vivo*. **Oncology Reports**, v. 28(6), p. 2077-2082, 2012.

FAVAROLO, B. et al. Role of apoptosis in disease. **Aging**, v. 4, p. 330-349, 2012.

FERLAY, J. et al. GLOBOCAN 2008 v2.0, **Cancer Incidence and Mortality Worldwide**: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>>, acesso em 16 out 2013.

FUCHS, Y.; STELLER, H. Programmed cell death in animal development and disease. **Cell**, v. 147, p. 742-758, 2011.

GARRIDO, C. et al. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. **Cell Death and Differentiation**, v. 13, p. 1423–33, 2006.

GOTTESMAN, M. M. Mechanisms of cancer drug resistance. **Annual Review of Medicine**, v. 53, p. 615-627, 2002.

GUELEN, L. et al. TAT-apoptin efficiently delivered and induces apoptosis in cancer cells. **Oncogene**, v. 23, p. 1153-1165, 2004.

GÜTTLER, T. et al. NES consensus redefined by structures of PKI-type and Rev-type nuclear export signals bound to CRM1. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 17(11), p. 1367-1376, 2010.



HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HEILMAN, D. W.; TEODORO, J. G.; GREEN, M. R. Apoptin nucleocytoplasmic shuttling is required for cell type-specific localization, apoptosis, and recruiting of the anaphase-promoting complex/cyclosome to PML bodies. **Journal of Virology**, v. 80(15), p. 7535-7545, 2006.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770–776, 2000.

HSU, H. et al. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. **Cell**, v. 81, p. 495–504, 1995.

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, p. 69–90, 2011.

JIN, J. et al. PTD4-apoptin protein and dacarbazine show a synergistic antitumor effect on B16-F1 melanoma *in vitro* and *in vivo*. **European Journal of Pharmacology**, v. 654, p. 17-25, 2011.

KERR, J. F. R. et al. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, p. 239-257, 1972.

KISCHKEL, F. C. et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. **EMBO Journal**, v. 14, p. 5579–88, 1995.

KLANRIT, P. et al. Specific isoforms of p73 control the induction of cell death induced by the viral proteins, E1A or apoptin. **Cell Cycle**, v. 7(2), p. 205-215, 2008.

KOSUGI, S. et al. Nuclear export signal consensus sequences defined using a localization-based yeast selection system. **Traffic**, v. 9, p. 2053-2062, 2008.

KOZAK, M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. **Nucleic Acids Research**, v. 15(20), p. 8125-8148, 1987.

KUCHARSKI, T. J. et al. DNA damage response signaling triggers nuclear localization of the chicken anemia virus protein apoptin. **Journal of Virology**, v. 85(23), p. 12638-12649, 2011.

KUROSAKA, K. et al. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. **Journal of Immunology**, v. 171, p. 4672-4679, 2003.

LA COUR, T. et al. Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 17(6), p. 527-536, 2004.

LANZ, H. L. et al. Mitotic catastrophe triggered in human cancer cells by the viral protein apoptin. **Cell Death and Disease**, v. 4, e487, 2013.

LANZ, H. L. et al. Proteasomal insensitivity of apoptin in tumor cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 422, p. 169-173, 2012.

LEE, M. S. et al. Production and diagnostic application of a purified, *E. coli*-expressed, serological-specific chicken anaemia virus antigen VP3. **Transboundary and Emerging**, v. 58(3), p. 232-239, 2011.

LELIVELD, S. R. et al. Apoptin's functional N- and C-termini independently bind DNA. **FEBS Letters**, v. 557(1-3), p. 155-158, 2004.

LEVESQUE, A. A.; EASTMAN, A. p53-based cancer therapies: is defective p53 the Achilles heel of the tumor? **Carcinogenesis**, v. 28, p. 13-20, 2007.

LEVINE, A. J. et al. The p53 pathway: what questions remain to be explored? **Cell Death and Differentiation**, v. 13, p. 1027-1036, 2006.

LEWIN, B. et al. Oncogenes and cancer. In: \_\_\_\_\_. **Genes VIII**. 8. ed. Upper Saddle River: Pearson Prentice Hall, 2004. Cap. 30, p. 889-937.

LI, J. et al. TAT-apoptin induces apoptosis in the human bladder cancer EJ cell line and regulates Bax, Bcl-2, caspase-3 and surviving expression. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 3, p. 1033-1038, 2012.

LI, Q. et al. AdHu5-apoptin induces G2/M arrest and apoptosis in p53-mutated human gastric cancer SGC-7901 cells. **Tumor Biology**, v. 34(6), p. 3569-3577, 2013.

LI, X. et al. Potent anti-tumor effects of a dual specific oncolytic adenovirus expressing apoptin *in vitro* and *in vivo*. **Molecular Cancer**, v. 9(10), p. 1-12, 2010.

LIN, J.; HU, J. SeqNLS: Nuclear Localization Signal Prediction Based on Frequent Pattern Mining and Linear Motif Scoring. **PLoS ONE**, v. 8(10), p. 1-12, 2013.

LISOWSKA, E. The role of glycosylation in protein antigenic properties. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, p. 445-455, 2002.

LIU, F. S. Resistance in cancer therapy – a quick review. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 48(3), p. 239-244, 2009.

LIU, L. et al. Therapeutic efficacy of an hTERT promoter-driven oncolytic adenovirus that expresses apoptin in gastric carcinoma. *International Journal of Molecular Medicine*, v. 30, p. 747-754, 2012.

LIU, Q. et al. Survivin knockdown combined with apoptin overexpression inhibits cell growth significantly, **Cancer Biology and Therapy**, v. 7, p. 1053-1060, 2008.

LIU, X. et al. Involvement of sphingolipids in apoptin-induced cell killing. **Molecular Therapy**, v. 14(5), p. 627-636, 2006.

LOCKSLEY, R. M. et al. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. **Cell**, v. 104 (4), p. 487-501, 2001.

LOS, M. et al. Apoptin, a tumor-selective killer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1793, p. 1335-1342, 2009.

LOWE, S. W. et al. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. **Cell**, v. 74(6), p. 957-967, 1993.

MADDIKA, S. et al. Cancer-selective therapy of the future. **Cancer Biology and Therapy**, v. 5 (1), p. 10-19, 2006.

MADDIKA, S. et al. Cancer-specific toxicity of apoptin is independent of death receptors but involves the loss of mitochondrial membrane potential and the release of mitochondrial cell death mediators by a Nur77-dependent pathway. **Journal of Cell Science**, v. 118, p. 4485-4493, 2005.

MADDIKA, S. et al. Unscheduled Akt-triggered activation of cyclin-dependent kinase 2 as a key effector mechanism of apoptin's anticancer toxicity. **Molecular and Cellular Biology**, v. 29(5), p. 1235-1248, 2009.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. **American Journal of Pathology**, v. 146(1), p. 3-15, 1995.

MARIÑO, G.; KROEMER, G. Mechanisms of apoptotic phosphatidylserine exposure. **Cell Research**, v. 23(11), p. 1247-1248, 2013.

NATIONAL CARE INSTITUTE. **Understanding Cancer Series**. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/understandingcancer>>. Acesso em: 06 mai. 2013.

NOTEBORN, M. H. M. et al. A single chicken anemia virus protein induces apoptosis. **Journal of Virology**, v. 68, p. 346-351, 1994.

NOTEBORN, M. H. M. et al. Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle. **Journal of Virology**, v. 65, p. 3131-3139, 1991.

NOTEBORN, M. H. M. Proteins selectively kill tumor cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 625, p. 165-173, 2009.

NOTEBORN, M. H. M.; DANEN-VAN OORSCHOT, A. A. A. M.; VAN DER EB, A. J. The Apoptin® gene of chicken anemia virus in the induction of apoptosis in human tumorigenic cells and in gene therapy of cancer. **Gene Therapy and Molecular Biology**, v. 1, p. 399-406, 1998.

OGRETMEN, B.; HANNUN, Y. A. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. **Nature Reviews Cancer**, v. 4(8), p. 604-616, 2004.

OLIJSLAGERS, S. et al. Additive effect of apoptin and chemotherapeutic agents paclitaxel and etoposide on human tumour cells. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 100, p. 127-131, 2007.

PALOMARES, L. A.; ESTRADA-MONDACA, S.; RAMÍREZ, O. T. Production of recombinant proteins: challenges and solutions. **Methods in Molecular Biology**, v. 267, p. 15-52, 2004.

PAN, Y. et al. Antitumor effects of a recombinant pseudotype baculovirus expressing apoptin *in vitro* and *in vivo*. **International Journal of Cancer**, v. 126, p. 2741-2751, 2010.

PIETERSEN, A. M. et al. Specific tumor-cell killing with adenovirus vectors containing the apoptin gene. **Gene Therapy**, v. 6, p. 882-892, 1999.

POON, I. K. et al. Apoptin nuclear accumulation is modulated by a CRM1-recognized nuclear export signal that is active in normal but not in tumor cells. **Cancer Research**, v. 65, p. 7059-7064, 2005.

RANG, H. P. et al. Fármacos anticâncer. In: \_\_\_\_\_. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier. Cap. 55, p. 673-688, 2012.

RENEHAN, A. G. What is apoptosis, and why is it important?. **British Medical Journal**, v. 322, p. 1536-1538, 2001.

RUSSELL, W. C. Update on adenovirus and its vectors. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 2573-2604, 2000.

RUSSO, A. et al. Apoptosis: a relevant tool for anticancer therapy. **Annals of Oncology**, v. 17(7), p. 115-123, 2006.

SAELENS, X. et al. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. **Oncogene**, v. 23, p. 2861–2874, 2004.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001.

SAVIL, J.; FADOK, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. **Nature**, v. 407, p. 784-788, 2000.

SCHOOP, R. A. A. L. et al. Bcl-xL inhibits p53- but not apoptin-induced apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma cell line. **Carcinogenesis**, v. 109(1), p. 38-42, 2004.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2013. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 63, p. 11–30, 2013.

STRACHAN, T.; READ, A.P. Cancer genetics. In: \_\_\_\_\_. **Human Molecular Genetics**. 4. ed. New York: Garland Science. Cap. 17, p. 537-568, 2010.

SUN, J. et al. PTD4-apoptin protein therapy inhibits tumor growth *in vivo*. **International Journal of Cancer**, v. 124, p. 2973-2981, 2009.

TAEBUNPAKUL, P. et al. Apoptin induces apoptosis by changing the equilibrium between the stability of TAp73 and  $\Delta$ Np73 isoforms through ubiquitin ligase PIR2. **Apoptosis**, v. 17, p. 762-776, 2012.

TEODORO, J. G. et al. The viral protein Apoptin associates with the anaphase-promoting complex to induce G2/M arrest and apoptosis in the absence of p53. **Genes & Development**, v 18, p. 1952-1957, 2004.

TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p. 211-223, 2006.

THOMPSON, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science**, v. 267, p. 1456-1462, 1995.

VAN DER EB, M. M. et al. Gene therapy with apoptin induces regression of xenografted human hepatomas. **Cancer Gene Therapy**, v. 9, p. 53-61, 2002.

WAJANT, H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. **Science**, v. 296 (5573), p. 1635-1636, 2002.

WHO. **The Global Burden of Disease: 2004 update**. Geneva: World Health Organization; 2008.

WICKMAN, G.; JULIAN, L.; OLSON; M. F. How apoptotic cells aid in the removal of their own cold dead bodies. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, p. 735-742, 2012.

XU, D. et al. Sequence and structural analyses of nuclear export signals in the NESdb database. **Molecular Biology of the Cell**, v. 23, p. 3677-3693, 2012.

YUAN, L. et al. Apoptin selectively induces the apoptosis of tumor cells by suppressing the transcription of HSP70. **Tumor Biology**, v. 34, p. 577-585, 2013a.

YUAN, L. et al. The efficacy of combination therapy using adeno-associated virus-mediated co-expression of apoptin and interleukin-24 on hepatocellular carcinoma. **Tumor Biology**, v. 34(5), p. 3027-3034, 2013.

YUASA, N.; TANIGUCHI, T.; YOSHIDA, I. Isolation and some properties of an agent inducing anaemia in chicks. **Avian Diseases**, v. 23, p. 366-385, 1979.

ZANELLA, J. R. C.; BRENTANO, L. *Circoviridae*. In: Flores, E.F., org. **Virologia veterinária**. 2. ed. Santa Maria: UFSM. Cap. 14, p. 419-438, 2012.

ZHANG, Y. H. et al. Activation of the tumor-specific death effector apoptin and its kinase by an N-terminal determinant of simian virus 40 large T antigen. **Journal of Virology**, v. 78(18), p. 9965-9976, 2004.

ZHANG, Y. H. et al. The viral protein apoptin induces apoptosis in UV-C-irradiated cells from individuals with various hereditary cancer-prone syndromes. **Cancer Research**, v. 59, p. 3010-3015, 1999.

ZHOU, S. et al. Mechanisms of apoptin-induced cell death. **Medical Oncology**, v. 29(4), p. 2985-2991, 2012.

ZHUANG, S. et al. Differential sensitivity to Ad5 E1B-21kD and Bcl-2 proteins of apoptin-induced versus p53-induced apoptosis. **Carcinogenesis**, v. 16(12), p. 2939-2944, 1995.

ZIMMERMAN, R. et al. PP2A inactivation is a crucial step in triggering apoptin-induced tumor-selective cell killing. **Cell Death and Disease**, v. 3, e291, 2012.



## 8. VITA

### *Dados Pessoais:*

Nome: Marcus Braga Knak

Endereço: Rua Mata Bacelar, 201 ap. 14, Bairro Auxiliadora, Porto Alegre / RS / Brasil – CEP: 90540-150

E-mail: marcusknak@hotmail.com

Telefone: (51) 3029-2170

### *Formação Acadêmica/Titulação:*

2012 – 2014: Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

2005 – 2011: Graduação em Biomedicina pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

### *Publicações:*

DOS SANTOS, H.F.; KNAK, M.B.; DE CASTRO, F.L.; SLONGO, J.; RITTERBUSCH, G.A.; KLEIN, T.A.P.; ESTEVES, P.A.; SILVA, A.D.; TREVISOL, I.M.; CLAASSEN, E.A.W.; CORNELISSEN, L.A.H.M.; LOVATO, M.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M.; RIJSEWIJK, F.A.M. Variants of the recently discovered avian gyrovirus 2 are detected in Southern Brazil and The Netherlands. **Veterinary Microbiology**, Netherlands, v.155, p.230-236, 2012.