Aline Hunger Ribeiro

Avaliação dos mecanismos moleculares das vias de p53/ARF e
IFN β envolvidos com a resposta de células de melanoma ao
tratamento com os transgenes p19Arf e IFN β

São Paulo

2016

Aline Hunger Ribeiro

Avaliação dos mecanismos moleculares das vias de p53/ARF e
IFN β envolvidos com a resposta de células de melanoma ao
tratamento com os transgenes p19Arf e IFN β

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências
Programa de Oncologia
Orientador: Prof. Dr. Bryan Eric Strauss

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Ribeiro, Aline Hunger

Avaliação dos mecanismos moleculares das vias de p53/ARF e IFN β envolvidos com a resposta de células de melanoma ao tratamento com os transgenes p19Arf e IFN β / Aline Hunger Ribeiro. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.

Orientador: Bryan Eric Strauss.

Descritores: 1.Melanoma 2.Inibidor de quinase dependente de ciclina p19
3.Interferon beta 4.p53 5.Adenoviridae 6.Apoptose 7.Morte celular

USP/FM/DBD-269/16

À Maura Lia Studart Hunger e Bruna Hunger Ribeiro

AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda minha família. À minha mãe Maura, minha irmã Bruna, minha vó Lia, minhas primas e primos Carol, Ju, Dri, Dani, Paulinho, Keyvan, Peta e Renato, minhas tias e tios Mônica, Cinthia, Marilu, Marcelo, Arnaldo Jr, Djamshid, Pietro, Luciana e Paulo. Aos patrulheiros Fábio Chuck e Felipe Felps. Por todo o amor, carinho e apoio incondicionais, sempre.

Ao prof Dr Bryan Eric Strauss, por todos os ensinamentos, discussões, ideias e direcionamento. Por ter me concedido essa oportunidade, me recebido em seu grupo e ter confiado em mim. Obrigada por ter me ajudado a ser a pessoa que sou hoje.

À Fapesp, pelo financiamento imprescindível para o desenvolvimento e elaboração desse projeto.

Ao prof Dr Roger Chammas e ao Prof Dr José Eduardo Krieger, pelo apoio e oportunidade.

Aos alunos e funcionários do ICESP, InCor e Faculdade de Medicina da USP.

Agradeço à Daniela Zanatta por todos esses anos de ensinamentos e, principalmente, amizade. Pela ajuda sempre presente, desde que eu entrei no laboratório ao me mostrar os protocolos mais básicos, até os conselhos dados nos dias de hoje.

Ao Thiago Salles que, por todo o amor, carinho, apoio e companheirismo, se tornou uma pessoa muito importante pra mim, em tão pouco tempo. Obrigada também pelas ideias e sugestões.

Ao Ruan, João, Taynah e Marlous. Por incentivarem meu pensamento a voar, me lembrando de ter meus pés no chão.

Ao Paulo, pela paciência e análises estatísticas. Ao Samir, Ruana, Rodrigo, Gissele e Igor, pelas risadas, discussões e por fazer os dias no laboratório descontraídos e agradáveis, às normas da CiBio, claro!

À Naiele Hellen, pelas conversas e conselhos de corredor. Muito obrigada por sua amizade.

À Silvina, Renata, Matheus e Tuty, pela paciência, microarray, festas juninas, anticorpos, corridas na atlética e essa mistura toda!

À Tainá, Duda, Wendy, Pequi, Martina, Carol e Danilo, por se tornarem minha família de São Paulo. Pela convivência cheia de amor e amizade. Por mais longe que estejam, carrego todos no coração.

Aos BT, um brinde! Agradeço à Mayra, Arnaldo, Diego, Joni, Vitor, Luli e Daninho pela amizade construída com risadas infinitas e cervejas geladas, obviamente.

Muito obrigada a todos.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

<i>LISTA DE FIGURAS</i>	12
<i>LISTA DE TABELAS</i>	14
<i>LISTA DE ABREVIATURAS</i>	15
<i>RESUMO</i>	19
<i>ABSTRACT</i>	21
<i>1 INTRODUÇÃO</i>	23
1.1 O melanoma	23
1.2 A via ARF-MDM2-p53 no melanoma.....	25
1.3 A ação do interferon- β (IFN β) na terapia do melanoma.....	28
1.4 Interação entre p53 e IFN β como um possível benefício para o tratamento de câncer	31
1.5 Desenvolvimento de vetores adenovirais para transferência gênica.....	32
1.6 Transferência gênica de p19Arf e IFN β em células de melanoma e carcinoma de pulmão murinos	35
<i>2 OBJETIVOS</i>	38
2.1 Caracterização da morte de células murinas B16F10 causada pela ação dos vetores contendo os transgenes p19Arf e IFN β combinados ou isolados.....	38
2.2 Verificar os efeitos dos transgenes sobre o crescimento tumoral de células B16F10 tratadas <i>in vitro</i> e inoculadas no flanco esquerdo de camundongos C57Bl/6 com a possível avaliação do efeito parácrino de IFN β	38
2.3 Caracterização da expressão gênica de células murinas em resposta ao tratamento com p19Arf e IFN β combinados em comparação com os tratamentos com esses genes isolados	38
2.4 Validação molecular e funcional de genes cuja expressão é diferenciada entre os tratamentos descritos no objetivo anterior	39
<i>3 MATERIAL E MÉTODOS</i>	40
3.1 Manutenção das linhagens celulares	40
3.2 Produção adenoviral	40
3.2.1 Amplificação do título viral	40
3.2.2 Produção viral em larga escala.....	41
3.2.3 Purificação do lisado viral bruto	41

3.3 Ensaio para verificar a viabilidade das células B16F10 transduzidas e seu crescimento celular	42
3.4 Ensaio de annexina-V e iodeto de propídeo para detectar células apoptóticas.....	43
3.5 Western blot para a detecção de alvos proteicos	43
3.5.1 Extração de proteínas	43
3.5.2 Western Blot.....	44
3.6 Ensaio para verificar a atividade de caspase-3	44
3.6.1 Produção e titulação das partículas lentivirais	45
3.6.2 Obtenção da linhagem B16F10 contendo o gene repórter de caspase-3	45
3.6.3 Verificação da atividade de caspase-3 em células transduzidas	46
3.7 Ensaio com Z-VAD-FMK para inibição de caspases	46
3.8 Detecção da liberação/exposição de fatores de morte imunogênica pelas células transduzidas com os vetores	47
3.8.1 Verificação da exposição de calreticulina	47
3.8.2 Verificação da liberação de ATP	48
3.8.3 Verificação da liberação de HMGB1	48
3.9 Tratamento tumoral <i>in vivo</i> com os vetores adenovirais em um modelo animal utilizando camundongos imunocompetentes	48
3.10 Ensaio para verificar o efeito parácrino de IFN β	49
3.11 Ensaio para verificar o perfil de expressão gênica	51
3.11.1 Extração de RNA	51
3.11.2 Tratamento do RNA com DNase I e purificação	52
3.11.3 Verificação da integridade do RNA	52
3.11.4 Verificação da expressão gênica	52
3.11.5 Análise estatística dos dados de expressão gênica	53
3.11.6 Validação da expressão gênica por PCR quantitativa.....	54
3.12 Validação funcional dos genes superexpressos pelo tratamento de p19 ^{Arf} + IFN β em ensaio de silenciamento da expressão gênica	56
3.12.1 Silenciamento da expressão gênica por transfecção com siRNA	56
3.12.2 Extração de RNA	57
3.12.3 Verificação da integridade do RNA	57
3.12.4 Validação do silenciamento da expressão gênica por PCR quantitativa.....	58

3.12.5 Análise do perfil do ciclo de células B16F10 após o silenciamento da expressão gênica e tratamento com p19Arf + IFN β	58
4 RESULTADOS.....	59
4.1 Células B16F10 tratadas <i>in vitro</i> com p19Arf + IFN β apresentam diminuição da viabilidade celular e inibição do crescimento.....	59
4.2 O tratamento de células B16F10 com p19Arf + IFN β induz a expressão de proteínas envolvidas com as vias de apoptose e necroptose.....	60
4.3 Células B16F10 tratadas com p19Arf + IFN β liberam fatores imunogênicos durante a morte	67
4.4 Tratamento de tumores de células B16F10 <i>in vivo</i> com IFN β acarreta na inibição do crescimento tumoral e aumento da sobrevivência de camundongos C57Bl/6	68
4.5 Efeito parácrino de IFN β atinge células vizinhas às transduzidas acarretando em um aumento dos efeitos antitumorais de IFN β	70
4.6 Análise da expressão gênica de células B16F10 tratadas com AdRGD-PG-p19Arf e/ou AdRGD-PG-IFN β	73
4.7 Análise da expressão das diferentes variantes de p73	89
4.8 Validação funcional dos genes superexpressos pelo tratamento de p19Arf + IFN β em ensaio de silenciamento da expressão gênica	90
5 DISCUSSÃO.....	96
6 CONCLUSÃO.....	108
7 BIBLIOGRAFIA	109
Anexo A - Rede de interação proteína-proteína dos genes menos expressos pelo tratamento combinado de p19Arf + IFN β e relacionados à função de ciclo celular. ...	132
Anexo B - Rede de interação proteína-proteína dos genes mais expressos pelo tratamento combinado de p19Arf + IFN β e relacionados à função de ativação do sistema imune.	133
Anexo C - Rede de interação proteína-proteína dos genes mais expressos pelo tratamento combinado de p19Arf + IFN β e relacionados à função de reparo de DNA.	134
Anexo D - Rede de interação proteína-proteína dos genes mais expressos pelo tratamento combinado de p19Arf + IFN β e relacionados à função de morte celular e apoptose.	135

Anexo E - Rede de interação proteína-proteína dos genes menos expressos pelo tratamento combinado de p19Arf + IFN β e relacionados à função de adesão celular.	136
Anexo F - Rede de interação proteína-proteína dos genes menos expressos pelo tratamento combinado de p19Arf + IFN β e relacionados à função de modelamento e organização da cromatina.	137
Anexo G - Rede de interação proteína-proteína dos genes mais expressos pelo tratamento combinado de p19Arf + IFN β e relacionados à função de regulação da transcrição gênica.	138
Anexo H - Rede de interação proteína-proteína dos genes menos expressos pelo tratamento combinado de p19Arf + IFN β e relacionados à função de respiração celular.	139
Anexo I - Função relacionada à regulação de morte celular enriquecida com os genes mais expressos exclusivamente após tratamento com a combinação de p19Arf + IFN β	140
Anexo J - Função relacionada ao reparo de DNA enriquecida com os genes mais expressos exclusivamente após tratamento com a combinação de p19Arf + IFN β	141
Anexo K - Função relacionada à regulação da transcrição gênica enriquecida com os genes mais expressos exclusivamente após tratamento com a combinação de p19Arf + IFN β	142
Anexo L - Função relacionada ao desenvolvimento embrionário enriquecida com os genes mais expressos exclusivamente após tratamento com a combinação de p19Arf + IFN β	145
Anexo M - Função relacionada à ativação do sistema imune enriquecida com os genes mais expressos exclusivamente após tratamento com a combinação de p19Arf + IFN β ..	146
Anexo N - Função relacionada à regulação do ciclo celular com os genes menos expressos exclusivamente após tratamento com a combinação de p19Arf + IFN β	147
Anexo O - Função relacionada à regulação de processos metabólicos enriquecida com os genes menos expressos exclusivamente após tratamento com a combinação de p19Arf + IFN β	149
Anexo P - Função relacionada à organização da cromatina enriquecida com os genes menos expressos exclusivamente após tratamento com a combinação de p19Arf + IFN β	150

Anexo Q - Função relacionada à respiração celular enriquecida com os genes menos expressos exclusivamente após tratamento com a combinação de p19Arf + IFN β	151
Anexo R - Função relacionada à morfogênese celular enriquecida com os genes menos expressos exclusivamente após tratamento com a combinação de p19Arf + IFN β	152
Anexo S - Função relacionada à adesão celular enriquecida com os genes menos expressos exclusivamente após tratamento com a combinação de p19Arf + IFN β	153
Anexo T - Manuscrito submetido à revista Human Gene Therapy	154

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Alça de retroalimentação entre p53 e MDM2	27
Figura 2: Representação esquemática da ligação e internalização do adenovírus	34
Figura 3: Células B16F10 tratadas com a combinação de p19Arf + IFN β apresentam menor viabilidade e crescimento <i>in vitro</i>	60
Figura 4: Células B16F10 tratadas com a combinação de p19Arf + IFN β apresentam maior marcação para Annexina-V <i>in vitro</i>	61
Figura 5: Detecção de PARP-1 em extratos de células B16F10 resolvidos por SDS-PAGE e avaliados por Western blot	62
Figura 6: Representação esquemática de um repórter de caspase-3 baseado na atividade de proteassomo (adaptado de Huang et al., 2011).	63
Figura 7: Células B16F10 tratadas com p19Arf apresentam aumento da ativação de caspase-3 <i>in vitro</i>	63
Figura 8: Z-VAD-FMK não inibe a morte de células B16F10 tratadas com os vetores <i>in vitro</i>	64
Figura 9: Detecção de RIPK3 em extratos de células B16F10 resolvidos por SDS-PAGE e avaliados por Western blot	65
Figura 10: PCR quantitativa do mRNA do gene TNFRSF1A evidenciando sua superexpressão na presença da combinação de p19Arf + IFN β em comparação com as outras condições	66
Figura 11: Detecção de LC3 β em extratos de células B16F10 resolvidos por SDS-PAGE e avaliados por Western blot	66
Figura 12: Exposição/liberação de fatores de morte imunogênica pelas células B16F10 transduzidas com os diferentes vetores	67
Figura 13: Tratamento <i>in vivo</i> em um modelo tumoral em camundongos imunocompetentes C57Bl/6	69
Figura 14: Efeito parácrino de IFN β é evidenciado <i>in vitro</i>	71
Figura 15: Efeito parácrino de IFN β é evidenciado <i>in vivo</i>	72
Figura 16: Perfil da integridade das amostras de RNA total	74
Figura 17: Diagrama de Venn com os genes mais expressos e menos expressos identificados através da comparação entre os diferentes tratamentos	76

Figura 18: Rede de interação proteína-proteína dos genes mais expressos pelo tratamento combinado de p19Arf + IFN β e relacionados à função de morte celular e apoptose.....	78
Figura 19: Rede de interação proteína-proteína dos genes mais expressos pelo tratamento combinado de p19Arf + IFN β e relacionados à função de reparo de DNA .	79
Figura 20: Rede de interação proteína-proteína dos genes mais expressos pelo tratamento combinado de p19Arf + IFN β e relacionados à função de regulação da transcrição gênica	80
Figura 21: Rede de interação proteína-proteína dos genes menos expressos pelo tratamento combinado de p19Arf + IFN β e relacionados à função de regulação do metabolismo celular.....	81
Figura 22: Rede de interação proteína-proteína dos genes menos expressos pelo tratamento combinado de p19Arf + IFN β e relacionados à função de modificação da cromatina	82
Figura 23: Rede de interação proteína-proteína dos genes menos expressos pelo tratamento combinado de p19Arf + IFN β e relacionados à função de respiração celular	83
Figura 24: PCR quantitativa dos genes de p53 (A), p21 ^{Waf1} (B), Mdm2 (C) e Puma (D) evidenciando a superexpressão desses genes na presença da combinação de p19Arf + IFN β em comparação com as outras condições	85
Figura 25: PCR quantitativa do gene de FoxO1 (A), Mdm4 (B), Nr3c1 (C), p73 (D), Phlda3 (E), RanBP9 (F) e Wdr46 (G) evidenciando a superexpressão desses genes na presença da combinação de p19Arf + IFN β em comparação com as outras condições .	87
Figura 26: PCR quantitativa do gene de Bcl-2 (A), cMyc (B), Mdh1 (C), Nek6 (D), Sin3A (E) e Tfap4 (F) mostrando que não é apenas o tratamento de p19Arf + IFN β que modula a expressão desses genes	89
Figura 27: Expressão das diferentes variantes de p73 após tratamento com os vetores	90
Figura 28: Porcentagem de células transfectadas com siRNA-FITC	91
Figura 29: Porcentagem de células B16F10 hipodiploides após silenciamento da expressão gênica e tratamento com p19Arf + IFN β	92
Figura 30: Expressão gênica de FoxO1, Nr3c1, p73, SIN3A, PHLDA3, RANBP9 e WDR46 após silenciamento da expressão gênica e tratamento com p19Arf + IFN β	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: <i>Multiplicity of infection</i> (MOI) dos vetores utilizados em células B16F10 para posterior extração de RNA.	51
Tabela 2: Sequências dos oligos usados para as reações de PCR quantitativa.....	55
Tabela 3: siRNAs utilizados para os ensaios de silenciamento da expressão gênica, o RNAm alvo para o silenciamento da expressão e a empresa da qual foi adquirido com o referente número de catálogo do produto.	57
Tabela 4: Número de genes regulados (mais ou menos expressos) por um tratamento em comparação a outro. Tratamentos: AdRGD-PG-eGFP (GFP), AdRGD-PG-p19 ^{Arf} (Arf), AdRGD-PG-IFN β (IFN β) ou AdRGD-PG-p19 ^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β (COMBO).	75
Tabela 5: Descrição dos resultados obtidos com o experimento de validação funcional dos genes por silenciamento da expressão gênica.	95

LISTA DE ABREVIATURAS

Ad	Adenovirus
Akt1	<i>V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 1</i>
APAF1	<i>Apoptotic Peptidase Activating Factor 1</i>
APE1	<i>Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1</i>
ARF	<i>Alternative Reading Frame</i>
Atg4	<i>Autophagy Related 4A</i>
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated Related</i>
Babam1	<i>BRISC and BRCA1 A Complex Member 1</i>
BAX	<i>BCL2-Associated X Protein</i>
Bcl-2	<i>B-Cell CLL/Lymphoma 2</i>
BNIP3	<i>BCL2/Adenovirus E1B 19 kDa Interacting Protein 3</i>
CAR	<i>Coxsackievirus and Adenovirus Receptor</i>
CARF	<i>Calcium Responsive Transcription Factor</i>
CDKN	<i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CMV	Citomegalovirus
cRNA	<i>Complementary RNA</i>
CTLA4	<i>Cytotoxic T Lymphocyte Associated 4</i>
DAVID	<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>
DEPEC	<i>Diethyl Pyrocarbonate</i>
DMEM	<i>Dulbecco 's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DNA-PK	<i>DNA-Dependent Protein Kinase</i>
DNp73	<i>Dominant Negative-p73</i>
DR	<i>Death Receptor</i>
FADD	<i>Fas (TNFRSF6)-Associated Via Death Domain</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>

FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
FoxO1	<i>Forkhead Transcription Factor</i>
GADD45	<i>Growth Arrest and DNA-Damage-Inducible 45</i>
Gapdh	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GR	<i>Glucocorticoid Receptor</i>
HBS	<i>Hanks' Balanced Salts</i>
HCT116	<i>Human Colon Cancer</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney Cell</i>
HeLa	<i>Henrietta Lacks cell</i>
Hip	<i>Hsp70-Interacting Protein</i>
HipK2	<i>Homeodomain Interacting Protein Kinase 2</i>
HMGB1	<i>Nonhistone Chromatin Protein High-Mobility Group Box 1</i>
Hop	<i>Hsp70/Hsp90-Organizing Protein</i>
HPRD	<i>Human Protein Reference Database</i>
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
HT1080	<i>Human Fibrosarcoma Cell</i>
IFN	<i>Interferon</i>
IFNAR1	<i>Type-I Interferon Receptor</i>
IGF-BP3	<i>Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 3</i>
IKK	<i>IκB Kinase</i>
IL	<i>Interleukin</i>
IntAct	<i>The IntAct Molecular Interaction Database</i>
IP-10	<i>IFNγ-Inducible Protein-10</i>
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i>
IRF	<i>Interferon Regulatory Factor</i>
ISG	<i>Interferon Stimulated Gene</i>
ISGF	<i>Interferon-Stimulated Gene Factor</i>
ISRE	<i>Interferon Stimulated Response Element</i>
ITR:	<i>Inverted Terminal Repeats</i>
JAK	<i>Janus Kinase</i>
LacZ	<i>Beta-Galactosidase</i>
LC3	<i>Light Chain 3</i>

LisH	<i>Lissencephaly Type 1 (Lis1) Homologous</i>
LUBAC	<i>Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex</i>
Luc	<i>Luciferase</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MART-1	<i>Melanoma Ag Recognized by T Cells 1</i>
Mdh1	<i>Malate Dehydrogenase 1</i>
MDM2	<i>Murine Double Minute 2</i>
MDM2	<i>Murine Double Minute 4</i>
MDR	<i>Multidrug Resistance</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MINT	<i>The Molecular Interaction Database</i>
MLKL	<i>Mixed Lineage Kinase Like</i>
MMLV-RT	<i>Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase</i>
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
MPC-1	<i>Monocyte Chemotactic Protein</i>
Mpg	<i>N-Methylpurine DNA Glycosylase</i>
mTOR	<i>Mammalian Target Of Rapamycin</i>
Nek6	<i>NIMA-Related Kinase 6</i>
NEMO	<i>NF-κB Essential Modulator</i>
NF- κ B	<i>Nuclear Factor-κB</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
Nr3c1	<i>Nuclear Receptor Subfamily 3, Group C, Member 1</i>
OD	<i>Optical Density</i>
PARP	<i>Poly(ADP-ribose) Polymerase-1</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PD1	<i>Programmed Cell Death 1</i>
Phlda3	<i>Pleckstrin Homology-Like Domain, Family A, Member 3</i>
Prkcd	<i>Protein Kinase C, Delta</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
Pten	<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
PUMA	<i>p53 Up-Regulated Modulator of Apoptosis</i>
RanBP9	<i>Ran-Binding Protein 9</i>

Ras	<i>Rat Sarcoma Viral Oncogene</i>
RGD	<i>Arginina - Glicina - Ácido Aspártico</i>
RIN	<i>RNA Integrity Number</i>
RIPK	<i>Receptor Interacting Protein Kinase</i>
RMA	<i>Robust Multiarray Average</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
SAM	<i>Significance Analysis of Microarrays</i>
SCR	<i>Scramble</i>
SPRY	<i>Spla and the Ryanodine Receptor</i>
ssDNA	<i>Single Strain DNA</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activator of Transcription</i>
TAB:	<i>TAK1-Binding Protein</i>
TAK1	<i>TGF-Activated Kinase 1</i>
T-ALL	<i>Acute Lymphoblastic Leukemia</i>
TAp73	<i>Transactivating p73</i>
TdT	<i>Deoxynucleotidyl Transferase</i>
Tfap4	<i>Transcription Factor AP-4</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
Tnfrsf1A	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 1A</i>
TRADD	<i>TNFR1-Associated Death Domain</i>
TRAF2	<i>TNF-Receptor-Associated Ffactor 2</i>
TRAIL	<i>Tumor Necrosis Factor (Ligand) Superfamily, Member 10</i>
TSP1	<i>Thrombospondin 1</i>
UDG	<i>Uracil DNA Glycosylase</i>
UV	<i>Ultravioleta</i>
WAF1	<i>Wild-Type p53-Activated Fragment 1</i>
Wdr46	<i>WD Repeat Domain 46</i>

RESUMO

Ribeiro AH. *Avaliação dos mecanismos moleculares das vias de p53/ARF e IFN β envolvidos com a resposta de células de melanoma ao tratamento com os transgenes p19Arf e IFN β* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

O melanoma é uma forma de câncer com alto índice de morte devido, em parte, à sua tendência de formar metástases. Esse tipo tumoral apresenta deleção de CDKN2A e amplificação de HDM2 em aproximadamente 50 % dos casos, mas apenas 10 % apresentam mutação em p53. Aproveitando-se do fato de a maioria dos casos de melanoma retêm p53 selvagem, uma proteína supressora tumoral e fator de transcrição, utilizamos vetores adenovirais nos quais a expressão dos transgenes é controlada pelo p53 endógeno. Estes vetores foram aperfeiçoados com a inclusão de uma modificação na proteína fibra que permite a eficiente transdução de um amplo espectro de células. Utilizando estes vetores, nosso laboratório mostrou que o tratamento combinado, mas não individual, de vetores virais codificando p19Arf e IFN β (interferon-beta) induziu elevados níveis de morte em células de melanoma de camundongo, B16F10. Assim, iniciamos novos estudos que têm como alvo explorar os mecanismos de morte celular e identificar genes críticos cuja expressão é alterada frente o tratamento combinado e que agem como mediadores da resposta celular para a estratégia de transferência gênica. Com este projeto, transferimos a combinação gênica (p19Arf + IFN β) para células B16F10 e analisamos o tipo de morte celular induzido. Assim, detectamos o aumento da presença de marcadores de morte celular conhecidos, tais como de apoptose (atividade de caspases e exposição de fosfatidilserina) e de necroptose (expressão de RIPK3 e TNFR1), e a diminuição de um marcador de autofagia (expressão de LC3-II). Além disso, mostramos que a detecção dos três marcadores clássicos de morte imunogênica (ATP, calreticulina e HMGB1) foi possível somente quando as células B16F10 foram tratadas com a combinação de p19Arf + IFN β . Por fim, a avaliação do perfil de expressão gênica através de microarray de cDNA das células B16F10 tratadas com p19Arf + IFN β revelou expressão diferenciada de 1054 genes em comparação com células que receberam apenas somente um ou outro transgene. Em seguida, a expressão dos genes Nr3c1, RanBP9, Sin3A, Wdr46, FoxO1, Phlda3 e tp73 foi validada por qPCR

e estudos funcionais foram iniciados para revelar a participação destes na resposta celular. Dessa forma, desvendamos importantes aspectos da resposta de células B16F10 frente ao tratamento com p19Arf e IFN β .

Descritores: melanoma; inibidor de quinase dependente de ciclina p19; interferon beta; p53; adenoviridae; apoptose; morte celular.

ABSTRACT

Ribeiro AH. *Evaluation of molecular mechanisms of p53/ARF and IFN β pathways involved in the response of melanoma cells to treatment with p19Arf and IFN β transgenes* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

Melanoma is a form of cancer with a high death rate due, in part, to its tendency to generate metastasis. These tumors carry deletion of CDKN2A and amplification of HDM2 in nearly 50 % of cases, but only 10 % have mutations in p53. Taking advantage of the fact that most melanoma cases retain wild type p53, a transcription factor and tumor suppressor protein, we used adenoviral vectors in which transgene expression is controlled by endogenous p53. These vectors were improved with a modification of the fiber protein that allows efficient transduction of a broad spectrum of cells. Using these vectors, our laboratory showed that the combined treatment with viral vectors encoding p19Arf and IFN β (interferon-beta) induced high levels of B16F10 (mouse melanoma) cell death, but not when treated with these vectors individually. Thus, we initiated studies to explore the mechanisms of cell death and to identify critical genes involved in the response of B16F10 cells to treatment with p19Arf + IFN β . Here, we transferred p19Arf + IFN β genes to B16F10 cells and analyzed the type of cell death induced. In this regard, we detected an increase of cell death markers, such as apoptosis (caspase activity and exposure of phosphatidylserine) and necroptosis (RIPK3 and TNFR1 expression) and a decrease of an autophagy marker (LC3-II expression). Furthermore, we showed that the detection of three classic immunogenic cell death markers (ATP, calreticulin and HMGB1) was possible only when B16F10 cells were treated with p19Arf + IFN β combination. Lastly, assessment of gene expression profile using cDNA microarray analysis of B16F10 cells treated with p19Arf + IFN β revealed differential expression of 1054 genes compared to cells that received only one of the transgenes. Expression of Nr3c1, RanBP9, Sin3a, Wdr46, FoxO1, Phlda3 and TP73 genes was validated by qPCR and functional studies were started to reveal participation of these genes in the cellular response. Thus, we exposed important aspects of the B16F10 cellular response to treatment with p19Arf and IFN β .

Descriptors: melanoma; cyclin-depedent kinase inhibitor p19; interferon-beta; p53; adenoviridae; apoptosis; cell death.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O melanoma

O câncer de pele é o tipo mais comum no Brasil, em todas as populações, correspondendo a 25 % dos casos de câncer. No entanto, entre eles, apesar de o melanoma ser o tipo menos frequente, compreendendo 4 % dos casos, é a neoplasia mais grave, devido à sua alta possibilidade de gerar metástases (<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/sintese-de-resultados-comentarios.asp>). Esse câncer possui origem neuroectodérmica (Kim *et al.*, 2012), mais especificamente proveniente dos melanócitos (células produtoras de melanina), e pode ser do tipo benigno ou maligno. Quando não metastático, ou se diagnosticado precocemente, o prognóstico do melanoma é bom, pois pode ser tratado com excisão cirúrgica. No entanto, uma vez disseminado a órgãos distantes, a média de sobrevida dos pacientes cai drasticamente. A sobrevida em 5 anos de pacientes diagnosticados com melanoma localizado é de 98,3 %, enquanto que para o melanoma metastático é de 16,6 % (http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012, atualizado em Novembro de 2015).

O melanoma que não pode ser removido cirurgicamente é geralmente tratado com terapias sistêmicas, tais como os agentes alquilantes dacarbazina (DTIC), aprovado em 1975 pelo FDA (*US Food and Drug Administration*), e seu análogo temozolomida, que apresentam sobrevida média de 6,4 e 7,7 meses e taxa de resposta objetiva de 12 % e 14 %, respectivamente, não apresentando diferença significativa entre esses tratamentos (Bhatia *et al.*, 2009). Em 1998, o tratamento com altas doses de interleucina-2 (IL-2) foi aprovado pelo FDA para pacientes no estágio IV de melanoma, porém esse tratamento apresenta eficácia em 5 % – 10 % dos pacientes e raramente confere respostas duráveis (Schwartzentruber *et al.*, 2011). Alternativamente, os inibidores de vias de sinalização, como vemurafenib, dabrafenib, trametinib, têm apresentado boa função, mas também desenvolvimento de resistência (Roesch, 2015).

O melanoma foi um dos primeiros tipos de cânceres no qual o conceito de imunovigilância foi validado (Lesterhuis *et al.*, 2011). Com relação a terapias que estimulam o sistema imunológico do paciente, além da terapia com IL-2, foi desenvolvida uma vacina, constituída pelo peptídeo Gp100, que é capaz de gerar uma resposta de linfócitos T reativos contra o melanoma (Rosenberg *et al.*, 1998). Já em

2011, devido a um melhor conhecimento sobre a biologia do melanoma e a importância de imunoterapias no combate ao câncer, foi aprovado pelo FDA, para tratamento do melanoma não operável ou metastático, o uso de um anticorpo monoclonal (ipilimumab) que se liga ao CTLA-4, um regulador negativo de células T (Hodi *et al.*, 2010). A ação de ipilimumab foi comparada a de Gp100 e, enquanto Gp100 sozinho promove uma sobrevida de 6,4 meses, em combinação a ipilimumab, induz o aumento da sobrevida para 10,1 meses (Hodi *et al.*, 2010).

O sucesso obtido com ipilimumab incentivou a exploração de novos anticorpos imunomodulatórios que atuam sobre células T. O anticorpo monoclonal contra PD-1, pembrolizumab e nivolumab, foram aprovados pelo FDA para tratamento em pacientes que tiveram progressão do melanoma após receber ipilimumab ou algum tipo de terapia que tem a mutação em BRAF (BRAF^{V600}) como alvo. Em um estudo conduzido comparando o tratamento com pembrolizumab *versus* ipilimumab, os autores observaram que a sobrevida dentro de um ano foi de 74,1 % e 58,2 %, respectivamente. Nesse estudo, devido à melhor resposta observada durante um ano de tratamento com pembrolizumab, os pacientes que recebiam ipilimumab passaram a ser tratados com pembrolizumab (Robert *et al.*, 2015).

Além disso, associando a imunoterapia com a terapia gênica com vetores virais, o FDA aprovou mais recentemente o uso de um vetor oncolítico derivado do vírus da herpes simples que se replica apenas em células tumorais e produz GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), que aumenta a resposta imunológica do paciente contra o tumor. Em um estudo conduzido por Andtbacka e colaboradores (2015), pacientes com melanoma não ressecável cirurgicamente (estágios IIIB a IV) foram tratados com T-VEC (vetor oncolítico carregando o gene GM-CSF) ou com injeções subcutâneas de GM-CSF e foi observado que a sobrevida média foi maior com o uso de T-VEC (23,3 meses) comparado com GM-CSF injetado subcutaneamente (18,9 meses) (Andtbacka *et al.*, 2015).

Sendo assim, o uso de uma terapia que agregue a ativação do sistema imunológico do paciente no combate à doença primária e possíveis metástases, pode levar a um aumento significativo da sobrevida dos pacientes. Isso justifica a investigação de novas abordagens de imunoterapia para melanoma. Em nosso trabalho, temos proposto que a indução simultânea de morte celular e indução de resposta imunológica deve trazer grande benefício para o controle do tumor primário e, talvez,

das metástases. Temos demonstrado que a transferência gênica de p19Arf e IFN β age como uma imunoterapia (Medrano *et al.*, 2016; Catani *et al.*, dados não publicados) e estamos investindo na revelação dos mecanismo moleculares que regulam a resposta celular.

1.2 A via ARF-MDM2-p53 no melanoma

O principal fator de risco para o melanoma é a radiação ultravioleta (UV), sendo responsável por 80 % dos casos dessa doença (<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/sintese-de-resultados-comentarios.asp>). Após a ocorrência de danos no DNA causados, por exemplo, pela radiação UV, a proteína ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) é autofosforilada e se torna ativa, sendo capaz de fosforilar direta e indiretamente p53 (Bakkenist e Kastan, 2003). p53 também pode se tornar ativa em resposta a outros fatores de estresse, tais como hipóxia, deleção de nucleotídeos ou ativação de oncogenes (El-Deiry, 1997; 1998) e só age de forma relevante no ciclo celular no momento em que se torna estável e ativa. A proteína p53 possui grande importância em regular muitos processos vitais celulares, iniciando programas que cessam a proliferação e previnem a geração de células geneticamente alteradas. Uma vez ativa, p53 causa a parada do ciclo celular em G1, permitindo à via de reparação celular remover as lesões do DNA antes que ocorra a mitose ou promover um aumento da apoptose. A perda da atividade de p53 deixa a célula vulnerável à proliferação descontrolada e relativamente resistente à apoptose induzida por quimioterápicos ou radiação (Lowe e Ruley, 1993; Lowe, Ruley, *et al.*, 1993; Lowe, Schmitt, *et al.*, 1993). A p53 é fator transcricional de vários genes ligados ao ciclo celular [tais como p21 (CDKN1A), 14-3-3, GADD45 e B99], genes pró-apoptóticos (Bax, Fas/APO1, Killer/DR5, PIGs, p85, PAG608, IGF-Bp3) e genes ligados à inibição da angiogênese (Tsp1, BAI1, GD-AiF) (El-Deiry, 1998). Além disso, p53 age também como inibidora de transcrição de uma variedade de promotores, incluindo genes que bloqueiam a apoptose, como Bcl-2 (Miyashita *et al.*, 1994), e genes que proporcionam resistência a drogas quimioterápicas, como o *multidrug resistance gene*, MDR1 (Strauss *et al.*, 1995).

O gene de p53 é mutado ou deletado em 50 % dos casos de câncer (Hainaut *et al.*, 1998). A análise de mutações no gene p53 estabeleceu uma conexão entre

exposições à radiação ultravioleta (UV), dano ao DNA e carcinogênese de pele (Benjamin e Ananthaswamy, 2007). No entanto, sua frequência de mutação pode diferir entre os diferentes tipos de câncer, sendo de apenas 10 % para os casos de melanoma (<http://p53.iarc.fr/>, <http://cancergenome.nih.gov/>). Nos tipos de câncer que mantêm p53 selvagem, sua função pode ser atenuada através de sequestro no citoplasma ou degradação (Cuddihy e Bristow, 2004). Em uma célula normal sob condições estáveis, a proteína p53 é expressa em baixos níveis e possui uma baixa estabilidade na célula, graças à rápida degradação que ela sofre devido a sua ubiquitinação. MDM2 e MDM4 são conhecidos por inibir p53, pois podem se ligar à porção N-terminal de p53 bloqueando sua atividade transcricional (Momand *et al.*, 1992; Shvarts *et al.*, 1996) e, além disso, MDM2 atua como uma ligase E3 de ubiquitina, o que sinaliza a degradação proteasomal de p53 (Honda *et al.*, 1997). Esses genes são frequentemente superexpressos em cânceres humanos devido à amplificação gênica (Muthusamy *et al.*, 2006; Gembarska *et al.*, 2012), sendo o gene MDM2, especificamente, amplificado em 56 % dos casos de melanoma (Polsky *et al.*, 2001). Além disso, é interessante observar que o fator de transcrição da MDM2 é a própria p53, caracterizando assim um controle do tipo feedback negativo. A ligação de MDM2 a p53 é desfeita após ocorrer dano ao DNA (Shieh *et al.*, 1997), impedindo a regulação negativa de p53 por MDM2 e promovendo acúmulo da proteína p53. A fosforilação de p53, um dos fatores que a torna ativa na célula, inibe sua interação com MDM2, aumentando sua estabilização e meia-vida para aproximadamente 1-2 horas (Shieh *et al.*, 1997).

Além disso, a inativação de p53 no melanoma pode ser decorrente da deleção do locus *CDKN2A*, responsável por codificar as proteínas p14^{ARF} (ou p19^{Arf} em camundongos) e p16^{INK4A}. Em 50 % dos casos de melanoma, esse locus é perdido (Sharpless e Chin, 2003), sendo que a maioria dos tumores com p14^{ARF} mutado apresenta p53 tipo selvagem (Esteller *et al.*, 2000; Pinyol *et al.*, 2000). p14^{ARF} se liga a MDM2 inibindo a interação de MDM2 a p53 e, dessa forma, promove a estabilização de p53 (Zhang *et al.*, 1998). Além disso, p14^{ARF} promove um aumento da ligação de MDM2 a MDM4, o que causa a degradação de MDM4 (Li *et al.*, 2012). p14^{ARF} é induzida em resposta a ativação de oncogenes (Kamijo *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998) como, por exemplo, oncogenes celulares e virais, tais como Ras e o gene adenoviral E1A e, consequentemente, ocasiona ativação de p53 (Palmero *et al.*, 2002). p14^{ARF} pode também induzir apoptose de maneira independente de p53, como indicado por vários

primordial no controle do ciclo celular e na indução de apoptose. Aproveitando-se do fato de que o melanoma apresenta p53, é possível utilizar radiação, uma droga ou outro gene que ative o p53 endógeno no tratamento. Dados da literatura indicam que o IFN β exerce sua função, em parte, através da ativação da via de p53 (Takaoka *et al.*, 2003) ou p14^{ARF} (Sandoval *et al.*, 2004). Por estes motivos, temos interesse em explorar as possíveis interações entre IFN β e a via de p53.

1.3 A ação do interferon- β (IFN β) na terapia do melanoma

O sistema imunológico pode proteger o hospedeiro da oncogênese, controlando aspectos imunológicos de tumores em desenvolvimento, em um processo denominado imunoedição (Schreiber *et al.*, 2011). No entanto, durante o desenvolvimento tumoral, o câncer inibe o sistema imune através de vários mecanismos celulares e moleculares. A disfunção do sistema imune aumenta durante os estágios iniciais do câncer e durante a progressão da doença metastática, sendo que interferons (IFN) do tipo I podem interferir nesse processo. Dessa forma, o uso de IFN do tipo I é interessante por ocasionar uma resposta antitumoral através do sistema imune (Ravandi, Estrov, *et al.*, 1999; Ravandi, Rytting, *et al.*, 1999; Kantarjian *et al.*, 2006). Na primeira fase da imunoedição, o sistema imunológico elimina as células malignas geneticamente instáveis; na segunda fase ocorre um equilíbrio entre esses; enquanto que na terceira fase, as células que possuem um perfil menos imunogênico escapam do controle do sistema imunológico originando a neoplasia (Dunn *et al.*, 2004).

Os IFN são classificados de acordo com suas bases estruturais e propriedades antigênicas, e são agrupados em três famílias: tipo I, tipo II e tipo III. IFN do tipo I incluem a família do IFN α com todas as suas isoformas, o IFN β e outros IFN menos estudados, IFN- ω , IFN- τ , IFN- κ , e IFN- ϵ . Os IFN tipo I são produzidos por vários tipos celulares após ativação de receptores de reconhecimento de padrão (*pattern recognition receptors* - PRR), os quais respondem a componentes bacterianos ou virais e a moléculas endógenas localizadas em compartimentos inapropriados, tais como DNA citosólico ou extracelular e RNA extracelular (Zitvogel *et al.*, 2015). IFN γ , o único que pertence à família Tipo II, é secretado por linfócitos T e células NK em resposta a mitógenos ou antígenos específicos (Porta *et al.*, 2005). E mais recentemente, descobriu-se a família de IFN tipo III, ou IFNs- λ (IL-28/29) e suas isoformas, que são

produzidas por células epiteliais da mucosa (Kotenko, 2011) e, apesar de possuírem homologia estrutural com IFN tipo I e atuarem na mesma via de sinalização, atuam sobre um receptor restrito a células epiteliais da mucosa e células dendríticas plasmocitóides (Durbin *et al.*, 2013).

A atividade do sistema IFN tipo I pode causar morte celular e, por isso, necessita de controle preciso para evitar sua ativação inapropriada. Após a indução da via por um estímulo, o IRF-3 (*interferon regulatory factor-3*) é modificado por fosforilação e se torna ativo promovendo a transcrição de uma baixa quantidade de IFN β que, por sua vez, se liga ao seu receptor (*Type-I interferon receptor*, IFNAR), iniciando a transdução de sinal mediada pelo sistema Jak-STAT. Essa transdução de sinal culmina na ativação do complexo ISGF3 (contendo STAT-1 e STAT-2 fosforilados e IRF-9), que ativa a transcrição de genes que possuem o elemento ISRE (*interferon stimulated response element*) na sua região promotora, tais como IRF-7. A indução de IRF-7 fosforilado coopera com IRF-3 fosforilado ativando transcricionalmente os genes de IFN α/β que, juntos, se ligam aos seus receptores e fortalecem o sistema de ativação de IFN através de um mecanismo de retroalimentação positiva. Como consequência, ocorre a expressão de MHC, citocinas e fatores quimiotáticos. Estes fatores podem ativar o sistema imune via células T CD4+, T CD8+, proporcionar maturação de células dendríticas, acarretar na atração de macrófagos e induzir apoptose (Sato *et al.*, 2001), além de apresentarem propriedades antiangiogênicas (Brem *et al.*, 1993).

A eficácia de quimioterapias convencionais, agentes antitumorais com alvos específicos, radioterapias e imunoterapias pode depender da sinalização do IFN tipo I para a indução de seus efeitos antineoplásicos. Por exemplo, a terapia com antraciclinas é considerada imunogênica, pois causa a liberação de RNA derivado de células tumorais, que ativam TLR3 (*Toll-Like Receptor 3*) e induzem a secreção de IFN tipo I (Casares *et al.*, 2005), e tem seu efeito perdido com a administração conjunta de um anticorpo monoclonal neutralizante de IFNAR1, em tumores transplantados em camundongos (Sistigu *et al.*, 2014). Já o uso de ciclofosfamida em pacientes com cânceres hematológicos direciona o perfil da expressão gênica de leucócitos para uma assinatura relacionada a IFN (Moschella *et al.*, 2013). A radioterapia também pode induzir a produção de IFN β por células mielóides causando efeitos antineoplásicos que são perdidos em camundongos *Ifnar1*^{-/-}, ou cujas células hematopoiéticas são *Ifnar1*^{-/-} (Burnette *et al.*, 2011). Imiquimod, que é um agonista sintético de TLR7 e TLR8

aplicado topicamente em cânceres de pele, recruta células dendríticas para o tumor que, por sua vez, produzem IFN tipo I e promovem a morte de células tumorais (Drobits *et al.*, 2012). A ação de drogas que agem sobre pontos de checagem do sistema imune, tais como ipilimumab, que tem como alvo a proteína CTLA4 (*cytotoxic T lymphocyte associated protein 4*), e nivolumab, que age sobre PD1 (*programmed cell death protein 1*), pode envolver IFN tipo I, uma vez que seus efeitos são perdidos em camundongos portadores de melanoma e deficientes para STING, um PRR que reconhece ácidos nucleicos citosólicos (Woo *et al.*, 2014). Por fim, drogas imunomodulatórias, como a lenalidomide contra o mieloma múltiplo, têm seus efeitos relacionados à diminuição da secreção de TNF (*tumour necrosis factor*), ao aumento da síntese de IL2 (interleucina 2), à indução da degradação proteasomal de IRF4 e à ativação de IRF7, causando a estimulação da produção de IFN β (Zhang *et al.*, 2013).

Proteínas recombinantes de IFN α/β são usadas para o tratamento de algumas formas de câncer (Sato *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 2004). O tratamento sistêmico com IFN α -2b é aprovado pelo FDA como uma terapia adjuvante para pacientes nos estágios IIb ou III de melanoma ressecado, pois pode aumentar a sobrevida livre de doença para 3,8 anos (*versus* 2,8 anos) (Kirkwood *et al.*, 2000), embora o aumento da sobrevida total seja pequeno (Mocellin *et al.*, 2010). IFN β possui efeito antitumoral mais potente que o IFN α contra o melanoma (Johns *et al.*, 1992; Borden *et al.*, 2011), talvez por induzir mais fortemente a transcrição de genes estimulados por IFN (ISGs) (Leaman *et al.*, 2003). No entanto, sua curta meia-vida, de apenas 3-5 horas, pode ser a causa da ineficácia em erradicar tumores sólidos (Einhorn e Grandner, 1996; Salmon *et al.*, 1996). Além disso, a ligação não-específica do IFN tipo I a tecidos não tumorais e a toxicidade associada a altas doses administradas limitam o uso dessa terapia (Sabel e Sondak, 2003; Kavanagh *et al.*, 2005). O uso sistêmico de IFN tipo I pode ter efeitos imunossupressivos (Lotrich, 2009) e é acompanhado de efeitos adversos, tais como fadiga, anorexia, hepatotoxicidade, sintomas semelhantes aos de gripe e depressão (Kreutzer *et al.*, 2004), o que justifica as tentativas de especificamente entregar o IFN ao microambiente tumoral.

A fim de superar estas limitações decorrentes da administração de IFN α/β , métodos de transferência gênica, tais como plasmídeos ou vetores virais (por exemplo, adenovírus), têm sido testados em modelos tumorais (Sakurai *et al.*, 1988; Natsume *et al.*, 1999; Natsume *et al.*, 2000; Cao *et al.*, 2001; Sakurai *et al.*, 2003). Como resultado,

foi possível observar a indução de apoptose, produção de interleucinas (IL)-1 β , IL-6, TNF (*tumor necrosis factor*), MPC-1 (*monocyte chemotactic protein*), IFN γ -inducible protein-10 (IP-10) e HSP (*heat shock protein*), além de IFN β , em células de glioma. A transferência gênica de IFN β ativa respostas do sistema imune e facilita a imuno-infiltração celular (Yoshida *et al.*, 2004), induzindo a expressão dos quimioatraentes de células T e dendríticas, CCL8 e CCL20 (Borden *et al.*, 2011). Além disso, foi observada a indução de TRAIL, o que contribui para a apoptose de células de melanoma após tratamento com IFN β (Chawla-Sarkar *et al.*, 2002; Chawla-Sarkar *et al.*, 2003; Reder *et al.*, 2008). Utilizando um modelo de melanoma com células B16F10 no camundongo C57BL/6, a metástase foi reduzida com tratamento gênico diretamente nos tumores primários ou com injeção sistêmica com um adenovírus (Alizadeh *et al.*, 2003).

Até o momento, 9 protocolos clínicos foram realizados com a transferência gênica de IFN β para tumores. Para câncer de ovário e melanoma foi utilizada a transferência gênica por lipofecção de plasmídeo, enquanto para glioma, glioblastoma, câncer de próstata, mesotelioma e câncer colorretal, o método de transferência foi o adenovírus. Além disso, existem 8 protocolos que envolvem a transferência gênica de IFN α 2b para câncer de bexiga, melanoma, carcinoma de célula escamosa da cabeça e pescoço, angiotelioma e mesotelioma e malignidades pleurais, sendo a transferência gênica realizada com plasmídeos ou vetores adenovirais. Por fim, 14 protocolos clínicos utilizaram a transferência gênica de IFN γ , através de adenovírus, retrovírus ou lipofecção de plasmídeo, para tumores como linfomas de células B e T, próstata, melanoma, neuroblastoma e carcinoma de célula escamosa (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>). Em contraste, não foi encontrado nenhum protocolo clínico utilizando p14Arf como gene terapêutico.

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

Dados da literatura indicaram que existem interações funcionais entre as vias de p53 e IFN. Células tratadas com proteína recombinante IFN α ou IFN β respondem com um aumento do nível de proteína p53. Um elemento ISRE, responsivo a ISGF3, foi identificado no promotor do gene de p53, mostrando que a indução de p53 por IFN β é causada por ativação transcricional (Takaoka *et al.*, 2003). Este caso é intrigante, já que

a ativação de p53 é tipicamente associada com modificação pós-traducional, e não com aumento de sua transcrição (Levine, 1997). Sobretudo, foi demonstrado que a apoptose de células tumorais tratadas com proteína recombinante IFN α ou IFN β foi aumentada na presença de p53 (Takaoka *et al.*, 2003), demonstrando que o efeito pró-apoptótico de IFN envolve p53.

Em algumas linhagens celulares, o efeito citostático dos IFNs tipo I não requer p53 nem seu parceiro funcional p14ARF; em outras linhagens celulares, a indução de apoptose requer p14ARF, mas não p53 (Sandoval *et al.*, 2004). Além disso, p53 ativa diretamente a expressão de IRF-5 (Mori *et al.*, 2002), mas a função de IRF-5, um candidato supressor de tumor, não depende de p53 (Hu *et al.*, 2005). IRF-5 pode iniciar a expressão de genes pró-apoptóticos, como BAX, APAF1, Caspase 8, Caspase 9 e o próprio IFN β . Apesar da função de IRF-5 não depender de p53, ambos possuem efeito complementar (Mori *et al.*, 2002).

O tratamento prolongado com proteína recombinante de IFN β induz senescência de uma maneira dependente de p53 (Moiseeva *et al.*, 2006). Fibroblastos normais submetidos ao tratamento com IFN β por um curto período (6 dias) não apresentam ativação de p53, entretanto o tratamento prolongado (12 dias) resulta na fosforilação de p53 na posição Ser15, elevando sua atividade transcricional de maneira dependente de ATM, um dos principais sinalizadores de p53. IFN β induz senescência de forma eficiente na presença de RasV12 (a forma oncogênica), indicando que IFN β poderia ter um impacto importante em células pré-malignas (Moiseeva *et al.*, 2006).

Além disso, a perda do número de cópias do cluster no cromossomo 9p21.3, onde está localizado o gene do IFN β 1, inclui também os genes CDKN2A e CDKN2B, e está associada a prognóstico ruim em melanomas (Linsley *et al.*, 2014).

1.5 Desenvolvimento de vetores adenovirais para transferência gênica

Protocolos clínicos de terapia gênica têm sido abordados durante os últimos 27 anos, predominantemente nos Estados Unidos e na Europa. Durante esta experiência, 526 protocolos foram elaborados utilizando adenovírus como vetor de transferência gênica, sendo 382 destes direcionados para tratamento de câncer e, especificamente, 33 protocolos para o tratamento de melanoma (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>).

Vários são os motivos para se utilizar vetores recombinantes derivados do adenovírus (Ad) para transferência gênica: ele pode gerar altos títulos *in vitro* (em torno de 10×10^{12} partículas por mL), o que facilita sua utilização clínica; pode transduzir uma grande variedade de células de mamíferos; transduz células mitóticas e pós-mitóticas; causa baixa patogenicidade para humanos; possui uma grande fita dupla de DNA (suportando grandes inserções de até 7,5 kb); não integra seu DNA ao da célula hospedeira, não havendo risco de ativação ou inativação aleatória de genes; e possui um forte tropismo por células cancerosas, tornando-o assim um ótimo vetor para a terapia gênica de câncer (Russell, 2000; Roy-Chowdhury e Horwitz, 2002).

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

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

Os genes L, que iniciam sua transcrição depois da replicação do DNA viral, são responsáveis pela estrutura protéica da partícula viral. Dentre estas proteínas estão as responsáveis pelo reconhecimento entre o vírus e a célula. Proteínas virais chamadas *knob* se ligam ao receptor CAR (*coxsackie-adenovirus receptor*) na membrana celular, ativando assim outras proteínas de membrana chamadas integrinas $\alpha_v\beta$ que interagem com a base pentônica e possibilitam a internalização do vírus. Esta partícula viral entra na célula dentro de um endossomo, que posteriormente é lisado pela ação de proteínas do envoltório viral, liberando o vírus no citosol. O genoma do vírus é então liberado no

núcleo, onde passa a transcrever, replicar e empacotar as novas partículas virais (Russell, 2000; Roy-Chowdhury e Horwitz, 2002).

Figura 2: Representação esquemática da ligação e internalização do adenovírus. CAR, *Coxsackievirus and adenovirus receptor*. Fonte: Horwood *et al.* (2002).

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

HEK293, permitindo sua replicação com uma eficiência maior. Repetindo este processo, permite-se um aumento no título e no volume de células utilizadas para produção do Ad (Russell, 2000; Roy-Chowdhury e Horwitz, 2002).

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

Um problema fundamental referente à aplicação de vetores adenovirais é sua dependência do receptor CAR. Na ausência de CAR, o vetor adenoviral transduz a célula alvo com baixa eficiência. Nosso grupo já confirmou que a linhagem B16F10 não apresenta o receptor CAR e não é permissiva à transdução com vetores adenovirais. Contornando esse problema, modificações nas proteínas do capsídeo adenoviral podem ser feitas para melhorar a transferência gênica, tanto pela adição de novos receptores para proteínas tumorais na superfície do vírus, como pela retirada de epítomos que são fortemente reconhecidos pelo sistema imune antes da infecção viral (Ulasov *et al.*, 2007). No caso, a solução mais prática para aumentar a eficiência de transdução com vetores adenovirais envolve modificação da proteína fibra (entre resíduos 546 e 547) do adenovírus inserindo o tripeptídeo RGD. Com esta modificação, o receptor do vírus passa a ser sulfato de heparina e proteínas integrinas contendo α_v , mas não CAR. Como integrinas e heparinas são essencialmente ubíquos, o novo vetor adenoviral ganha capacidade de transduzir um amplo espectro de células alvos (Mizuguchi *et al.*, 2001).

1.6 Transferência gênica de p19Arf e IFN β em células de melanoma e carcinoma de pulmão murinos

Nosso grupo vem trabalhando com constante empenho no desenvolvimento de vetores virais relevantes para o tratamento antitumoral. A estratégia fundamental

desenvolvida é o uso de um promotor responsivo à p53 para dirigir a expressão do transgene contido no vetor viral. Para isto, foi montado um promotor responsivo a p53, denominado PGTx β (ou simplesmente PG) que foi inserido no vetor adenoviral, gerando os vetores Ad-PG. Foi mostrado que este promotor é até 5 vezes mais forte do que o promotor derivado do CMV e que este promotor podia ser ativado na presença de p53 funcional (Bajgelman e Strauss, 2008).

Além disso, em trabalhos anteriores, nosso grupo verificou que o vetor adenoviral tradicional, com a fibra nativa do sorotipo 5, é extremamente ineficiente em transduzir células B16F10 (melanoma murino, p53 selvagem, p19Arf deficiente), pois essas células não expressam o *coxsackie virus and adenovirus receptor* (CAR). Nesse trabalho, a expressão forçada de CAR em células B16F10 gerou as células B16mCAR e permitiu que a transdução com o vetor adenoviral fosse bem sucedida, transferindo os genes de p19Arf e interferon- β murino (mIFN β) às células B16F10. A partir disso, foi mostrado que existe uma cooperação entre os transgenes p19Arf e mIFN β para a indução de morte celular (Merkel *et al.*, 2013). Além disso, em ensaios *in vivo*, os transgenes ocasionaram redução do tamanho tumoral devido à morte celular apenas em animais com tumores tratados com a combinação p19Arf e IFN β e não com os transgenes isolados (Merkel *et al.*, 2013).

Uma vez que o procedimento para forçar a expressão de CAR é inconveniente, utilizamos o vetor AdRGD, que contém o tripeptídeo RGD entre resíduos 546 e 547 na fibra do capsídeo e é capaz de transduzir um amplo espectro de células alvos por não depender da presença de CAR nessas células (Mizuguchi *et al.*, 2001). Os vetores adenovirais AdRGD-PG-eGFP, AdRGD-PG-p19^{Arf}, AdRGD-PG-IFN β , e AdRGD-PG-IFN β^{IRES} -p19^{Arf} tiveram a expressão de seus transgenes explorada em cultura de células eficientemente e observamos que os vetores causam a morte das células B16F10 e parada do ciclo celular.

Nossos ensaios indicam com segurança que a combinação dos vírus AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β acarreta um nível de morte celular maior do que os vetores monocistrônicos isolados. Também verificamos em um modelo de vacina profilática em camundongos imunocompetentes C57Bl/6 que camundongos tratados com B16F10 previamente transduzida tanto com AdRGD-PG-IFN β quanto com a combinação de AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β apresentaram uma resposta imunológica contra o desafio tumoral realizado posteriormente à vacinação. No entanto,

apenas camundongos tratados com B16F10 transduzida com AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β apresentaram um aumento de sobrevida. Nesse trabalho, foi mostrado que essa resposta envolve a expressão de IL-15, ULBP1, FAS/APO1 e KILLER/DR5 pelas células B16F10 transduzidas, promovendo a ativação de células NK (Medrano *et al.*, 2016). Além disso, foi observado que as células presentes no linfonodo próximo ao sítio de vacinação apresentaram expressão de IL-12, IL-6, TNF- α , IFN- γ , MCP1/CCL2 e que isso acarretou na ativação de células T CD4⁺ e CD8⁺ que foram encontradas no infiltrado tumoral (Medrano *et al.*, 2016).

Em paralelo, foram feitos ensaios com esses mesmos vetores em células LLC-1 (modelo murino de carcinoma de pulmão). No entanto, nesses ensaios de terapia genica *in situ*, os vetores foram injetados intratumoralmente, consistindo um modelo de tratamento imunoterapêutico. Nesse modelo, foi observado que tanto o tratamento com AdRGD-PG-IFN β quanto com a combinação de AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β foram capazes de reduzir o crescimento tumoral, mas apenas camundongos que tiveram o tumor primário tratado com AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β apresentaram uma melhor rejeição do desafio do tumor secundário no flanco oposto. Além disso, foi observada a expressão de citocinas (CCL3, CXCL3, IL1 α , IL1 β , CD274 e OSM) e um aumento da população de neutrófilos no infiltrado tumoral primário apenas quando esse foi tratado com a combinação de AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β (Catani *et al.*, dados não publicados).

Os dados obtidos até o momento mostram claramente que existe uma cooperação entre p19^{Arf} e IFN β na indução de morte de células B16F10 e LLC-1 e estimulação do sistema imunológico do hospedeiro, o que não é obtido pelo uso dos transgenes isolados com o mesmo sucesso. Dessa forma, o intuito desse projeto foi verificar os genes e vias gênicas envolvidos com a morte de células B16F10 tratadas com os transgenes isolados ou em conjunto e descobrir novas ferramentas possíveis de serem exploradas no contexto da terapia gênica.

2 OBJETIVOS

Neste projeto, procuramos elucidar mecanismos moleculares que controlam a resposta de células B16F10 (melanoma de camundongo) ao tratamento com vetores adenovirais portadores dos cDNAs de p19Arf e IFN β , focando em mecanismos de morte celular e em expressão gênica diferencial.

2.1 Caracterização da morte de células murinas B16F10 causada pela ação dos vetores contendo os transgenes p19Arf e IFN β combinados ou isolados

- Transdução de células B16F10 com os vetores monocitrônicos AdRGD-PG-p19^{Arf} ou AdRGD-PG-IFN β isolados ou combinados
- Avaliação de alvos conhecidos envolvidos com apoptose, necroptose ou autofagia.
- Avaliação de marcadores de morte imunogênica (Calreticulina, ATP, HMGB1).

2.2 Verificar os efeitos dos transgenes sobre o crescimento tumoral de células B16F10 tratadas *in vitro* e inoculadas no flanco esquerdo de camundongos C57Bl/6 com a possível avaliação do efeito parácrino de IFN β

2.3 Caracterização da expressão gênica de células murinas em resposta ao tratamento com p19Arf e IFN β combinados em comparação com os tratamentos com esses genes isolados

- Transdução de células B16F10 com a combinação dos vetores monocitrônicos AdRGD-PG-p19^{Arf} ou AdRGD-PG-IFN β isolados *versus* tratamentos com os vetores monocitrônicos AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β combinados.
- Uso dos GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST Array (Affymetrix) para avaliar a expressão gênica global.
- Determinar se a alteração na expressão gênica com o tratamento combinado é capaz de se diferenciar dos tratamentos individuais e também identificar genes

que, possivelmente, agem como mediadores do efeito estimulado pela transdução com os vetores adenovirais.

2.4 Validação molecular e funcional de genes cuja expressão é diferenciada entre os tratamentos descritos no objetivo anterior

- Confirmação das alterações em expressão gênica por western blot e PCR quantitativa para identificar 2 ou 3 genes para ensaios funcionais.
- Ensaios funcionais: silenciamento ou superexpressão dos genes de interesse seguidos por avaliação do ciclo celular, indução de morte, proliferação e atividade de p53 endógeno.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Manutenção das linhagens celulares

A linhagem transformada por adenovírus HEK293A ou HEK293T (*human embryonic kidney* 293, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, GIBCO-BRL, Cat. N° 12100-046) suplementado com 10 % de FBS (*fetal bovine serum*, GIBCO-BRL, Cat. N° 10437-028), contendo 1X Antibiótico-Antimicótico (GIBCO-BRL, Cat. N° 15240062) sendo mantida a 37 °C em atmosfera úmida com 5 % de CO₂. A linhagem de melanoma murino B16F10 (B16F10, ATCC CRL-6475) foi cultivada como descrito acima, porém utilizando meio RPMI (GIBCO-BRL, Cat. N° 31800-022).

3.2 Produção adenoviral

3.2.1 Amplificação do título viral

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

-80 °C.

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

3.2.2 Produção viral em larga escala

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

3.2.3 Purificação do lisado viral bruto

Para a purificação, aplicou-se o lisado viral bruto em um gradiente de iodixanol para ultracentrifugação. Esse gradiente consistiu das seguintes soluções adicionadas cuidadosamente a tubos claros de 13,2 mL e 14x89 mm (Beckman, Cat. N° 344059),

seguindo-se a ordem da solução mais concentrada, na parte inferior do tubo, para a solução menos concentrada, na parte superior: 0,5 mL de 54 % (w/v) iodixanol em PBS 1X contendo 1 mM MgCl_2 e 25 mM KCl; 2 mL de 40 % (w/v) iodixanol em PBS 1X contendo 1 mM MgCl_2 e 25 mM KCl; 2 mL de 25 % (w/v) iodixanol em PBS 1X contendo 1 mM MgCl_2 e 25 mM KCl; e 2 mL de 15 % (w/v) iodixanol em PBS contendo 1 M NaCl, 1 mM MgCl_2 e 25 mM KCl. Aplicou-se cuidadosamente o lisado viral bruto (aproximadamente 4 mL) em cima do gradiente e o tubo foi então centrifugado a 35000 rpm usando um rotor sorvall swing bucket (Rotor Sorvall TH-G41) por 1 hora a 10 °C. Os adenovírus formam uma banda clara na interface das soluções de densidade de 25 % e 40 %. A banda foi removida com uma seringa, perfurando o tubo um pouco abaixo desta para não perturbá-la, e inserida em colunas PD-10 desalting contendo resina SephadexTM G-25 (GE, Cat. Nº 52-1308-00 BB). Antes de inserir a banda viral nas colunas, essas foram preparadas equilibrando-as com 25 mL de PBS 1X. Após inserir a banda viral na coluna, deve-se esperar que o líquido adentrasse nela completamente antes de eluir o vírus purificado. Para a eluição do vírus, inseriu-se aos poucos PBS 1X na coluna e coletou-se o eluente. Dessa forma, quando o eluente passou a apresentar uma coloração esbranquiçada, deve-se coletá-lo e estocá-lo com 7 % de glicerol a -80 °C. Esse estoque consiste da preparação viral purificada, a qual deve ser titulada com o kit Adeno-X Rapid Titer (Clontech, Cat. Nº 632250) para ser utilizada nos ensaios.

3.3 Ensaio para verificar a viabilidade das células B16F10 transduzidas e seu crescimento celular

Células B16F10 foram plaqueadas a 3×10^5 em placas de 6 cm e foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após, foram transduzidas separadamente com um MOI de 50 dos vírus AdRGD-PG-eGFP, AdRGD-PG-p19^{Arf}, AdRGD-PG-IFN β , AdRGD-PGIFN β ^{IRES}p19^{Arf} e de cada vetor da combinação AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β e, 24 horas após a transdução, foram contadas e replaqueadas a 5×10^3 em placas de 96 poços. Após 24, 48 e 72 horas, as células foram coradas com 25 μL de solução de MTT (5 mg/ml em PBS 1X) durante 4 horas a 37 °C em atmosfera úmida com 5 % de CO_2 e, após, lisadas com 100 μL de tampão de lise (20 % SDS em 50 % DMF, pH 4,7)

durante 16 horas a 37 °C. A leitura da absorbância foi feita a 590 nm em leitor de microplacas VictorTm (Perkin-Elmer, Waltham, MA, EUA).

Em paralelo, as células B16F10 que foram transduzidas, foram replaqueadas também para ensaio de crescimento celular a 2×10^4 em placa 12 poços e tripsinizadas após 24, 48, 72 e 96 horas do replaqueamento para a contagem das células viáveis, com o auxílio do azul de tripan.

3.4 Ensaio de annexina-V e iodeto de propídeo para detectar células apoptóticas

Para o ensaio de apoptose, células B16F10 foram plaqueadas a 1×10^5 por poço em placa de 6 poços e foram incubadas a 37 °C por 24 horas sendo, após, transduzidas com um MOI de 500 dos vírus Ad-PG-luc, AdRGD-PG-p19^{Arf}, AdRGD-PG-IFN β , e de cada vetor da combinação AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β . As células aderidas na placa e o meio de cultivo foram coletados 60 horas após a transdução e as células contadas. Para a marcação com annexina-V, 1×10^5 células foram centrifugadas a 1000 rpm, 4 °C por 5 minutos, lavadas com PBS 1X e centrifugadas novamente. Após, as células foram ressuspensas em 100 μ L de *annexin-binding buffer* (10 mM HEPES, 140 mM NaCl e 2,5 mM CaCl₂, pH 7,4) no qual foram diluídos 2,5 μ L da annexina-V conjugada a AlexaFluor[®] 488 (Molecular Probes – Invitrogen, Cat. N° A13201) e 1 μ L de iodeto de propídeo a 10 mg/mL. As células foram incubadas no escuro por 15 min à temperatura ambiente e, após, foram adicionados 400 μ L de *annexin-binding buffer* às células marcadas. A fluorescência emitida pela marcação foi medida por meio do citômetro de fluxo (Attune[®] Acoustic Focusing Cytometer, Thermo Fisher Scientific) e o perfil de células positivas para annexina-V foi analisado pelo Attune[®] Cytometer Software (Thermo Fisher Scientific).

3.5 Western blot para a detecção de alvos proteicos

3.5.1 Extração de proteínas

Para a extração de proteínas, coletamos tanto o meio de cultura contendo células mortas, como também as células aderidas. Lavamos as células em PBS 1X, centrifugamos a 1500 rpm por 5 minutos e ressuspendemos o pellet em 300 μ L de

tampão 1X de extração Cell Culture Lysis Reagent 5X (Promega, Cat. Nº E153A) contendo inibidores de proteases (Complete, Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets – Roche, Cat. Nº 04693124001) durante 10 minutos a 4 °C. Após a lise, a solução foi centrifugada a 12000 rpm por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante contendo as proteínas foi coletado e armazenado a -80 °C. Alternativamente, as células foram lisadas por sonicação em PBS 1X (10 ciclos de 10 segundos, espaçados por incubação por 10 segundos no gelo).

A concentração de proteínas foi determinada por coloração com Reagente de Bradford (BioAgency, Cat. Nº 500-0006N) e leitura espectrofotométrica a 595 nm comparando-se com gradiente de albumina. Utilizamos 30 ou 100 µg de cada extrato para a realização do western blot.

3.5.2 Western Blot

Os extratos celulares foram resolvidos em gel 12 % SDS-PAGE, transferidos eletroforéticamente para membrana de nitrocelulose Amersham™ Hybond™ – ECL (GE Healthcare Life Sciences, Cat. Nº D011361), que posteriormente foi bloqueada com 5 % de solução de leite em TBS-Tween 0,1 % e marcada com anticorpos. Para a detecção, foi utilizado o kit de detecção quimioluminescente Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Life Sciences, Cat. Nº RPN2209) e equipamento de detecção ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences).

Os anticorpos utilizados foram: anticorpo policlonal de coelho anti-PARP (Cell Signaling, Cat. Nº 9542), anticorpo policlonal de cabra anti-RIP3 (Santa Cruz Biotechnology, Cat. Nº SC-47364), anticorpo policlonal de cabra anti-p73α (Santa Cruz Biotechnology, Cat. Nº SC-7238), anticorpo monoclonal de coelho anti-LC3 (Cell Signaling, Cat. Nº 2775), anticorpo anti-coelho IgG (H+L)-conjugado a HRP (BioRad, Cat. Nº 170-6515) e anticorpo anti-cabra IgG (*whole molecule*)-conjugado a HRP (Sigma Aldrich, Cat. Nº A8919).

3.6 Ensaio para verificar a atividade de caspase-3

Para verificar a atividade de caspase-3, produzimos partículas lentivirais a partir de um vetor cedido por Chuan-Yuan Li (*University of Colorado School of Medicine*,

Aurora, Colorado, USA), denominado DEVD-CMV-GFP-luc, que expressa, a partir do promotor do citomegalovírus (CMV), a proteína GFP e luciferase fusionadas a um sítio de poliubiquitinação. Entre o sítio de poliubiquitinação e as proteínas repórteres, encontra-se uma sequência de clivagem por caspase-3, denominada DEVD (Huang *et al.*, 2011).

3.6.1 Produção e titulação das partículas lentivirais

As partículas virais foram produzidas cotransfectando-se os plasmídeos DEVD-CMV-GFP-luc (10 µg), pMDL-gag/pol RRE (6,5 µg), pRSVs-REV (2,5 µg) e pCMV-VSVg (3,5 µg) em 1×10^6 células HEK293T, semeadas 24 horas antes em placas de 60 mm. A transfecção foi realizada adicionando os plasmídeos a 250 µL de cloreto de cálcio (0,25 M) e precipitando-os através da adição de 250 µL do tampão fosfato de sódio/HEPES HBS-2X pH 7,05 (cloreto de sódio 274 mM, HEPES 40 mM, fosfato monoácido de sódio 2,8 mM). A suspensão contendo o precipitado de DNA foi gotejada sobre o meio de cultura das células plaqueadas e as células foram incubadas por 4 horas. Em seguida, as células foram submetidas a um choque de glicerol, o qual consistiu em tratá-las com PBS 1X contendo 15 % de glicerol durante 3 minutos, e após lavá-las com PBS 1X, sendo que, em seguida, adicionou-se meio DMEM com 10 % de FBS às células. O sobrenadante contendo as partículas virais foi coletado 24 e 48 horas após a transfecção e titulado.

A titulação viral foi realizada transduzindo-se 1 µL, 10 µL ou 100 µL de uma diluição de 1:1000 do vírus em 5×10^4 células HT1080 semeadas 24 horas antes em placas de 35 mm. O volume final da transdução foi de 600 µL de meio DMEM + 10 % FBS e contendo polybrene a 8 µg/mL. Após 6 a 8 horas, adicionou-se 1 mL de meio DMEM + 10 % FBS às células. No dia seguinte, o meio de cultura das placas foi trocado por meio contendo puomicina a 0,5 µg/mL e as células foram mantidas até que o controle negativo (células não transduzidas) morresse pela ação do antibiótico (aproximadamente 5 dias). Após, as colônias foram fixadas com metanol 100 %, coradas com Giensa 1X e contadas para a verificação do título viral.

3.6.2 Obtenção da linhagem B16F10 contendo o gene repórter de caspase-3

Células B16F10 foram plaqueadas a 1×10^5 em placas de 35 mm e transduzidas com MOI de 1 das partículas lentivirais em 600 μL de meio RPMI + 10 % FBS e contendo polybreno a 8 $\mu\text{g/mL}$ por 6 a 8 horas. Após esse período, adicionou-se 1 mL de RPMI + 10 % FBS às células. No dia seguinte, o meio de cultura das placas foi trocado por meio contendo puomicina a 0,5 $\mu\text{g/mL}$ e as células foram mantidas até que o controle negativo (células não transduzidas) morresse pela ação do antibiótico (aproximadamente 5 dias). Após esse período, as células foram mantidas por mais 7 dias com a metade da concentração inicial de puomicina.

3.6.3 Verificação da atividade de caspase-3 em células transduzidas

Células B16F10 contendo o repórter de caspase-3 foram semeadas a 1×10^5 em placas de 35 mm. No dia seguinte, as células foram transduzidas com um MOI de 500 dos vírus AdRGD-PG-GFP, AdRGD-PG-p19^{Arf}, AdRGD-PGIFN β , AdRGD-PGIFN β + AdRGD-PG-p19^{Arf} ou AdRGD-PGIFN β^{IRES} p19^{Arf}. Após 48 horas da transdução, as células foram coletadas e lisadas para análise da expressão de luciferase no leitor de microplacas VictorTm (Perkin-Elmer, Waltham, MA, EUA) na presença de luciferina (Promega, Cat. N° E2920).

3.7 Ensaio com Z-VAD-FMK para inibição de caspases

Células B16F10 foram plaqueadas a 1×10^5 em placas de 6 poços e foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após, foram transduzidas com um MOI de 500 dos vírus AdRGD-PG-eGFP, AdRGD-PG-p19^{Arf}, AdRGD-PG-IFN β ou AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β e, 4 horas após a transdução, o meio de cultivo foi substituído por meio de cultivo novo contendo 50 μM de Z-VAD(OMe)-FMK (Z-VAD-FMK, Santa Cruz Biotechnology, Cat. N° SC-3067). Alternativamente, as células foram tratadas com 50 μM de Z-VAD-FMK (Santa Cruz Biotechnology, Cat. N° SC-3067) por 4 horas e, após, o meio de cultivo foi substituído por meio de cultura novo contendo um MOI de 500 dos vetores ou doxorrubicina (1 μM). Após 72 horas da transdução, ou 24 horas após o tratamento com doxorrubicina, as células aderidas e em suspensão foram coletadas e fixadas em etanol 70 %, centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos a 4 °C,

lavadas com PBS 1X e centrifugadas novamente. O sobrenadante foi descartado e as células tratadas com 1 μ L de iodeto de propídeo a 10 mg/mL durante 30 minutos a 37 °C. Após este período, as células foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 0,5 mL de PBS 1X. A fluorescência emitida pelo iodeto de propídeo foi medida por meio do citômetro de fluxo (Attune® Acoustic Focusing Cytometer, Thermo Fisher Scientific). O perfil de ciclo celular foi analisado pelo Attune® Cytometer Software, Thermo Fisher Scientific.

3.8 Detecção da liberação/exposição de fatores de morte imunogênica pelas células transduzidas com os vetores

3.8.1 Verificação da exposição de calreticulina

Para verificar a exposição de calreticulina pelas células tratadas, 1×10^5 células B16F10 foram plaqueadas em placa de 6 poços e incubadas a 37 °C por 24 horas sendo, após, transduzidas com um MOI de 500 dos vírus AdRGD-PG-eGFP, AdRGD-PG-p19^{Arf}, AdRGD-PG-IFN β , e de cada vetor da combinação AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β . As células em suspensão, bem como as células aderidas, foram coletadas, lavadas com PBS 1X e incubadas em 100 μ L do anticorpo anti-calreticulina (Novus Biologicals, Cat. N° NB300-545) 1:500 em PBS 5 % BSA a 4 °C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 2 mL de PBS 1X às células e elas foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram incubadas em 300 μ L do anticorpo anti-rabbit conjugado a Alexa-488 (Invitrogen, Cat. N° A31627) 1:500 em PBS 5 % BSA a 4 °C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 2 mL de PBS 1X às células e elas foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram incubadas em 300 μ L de PBS e 1 μ L de iodeto de propídeo a 10 mg/mL por 5 minutos. A fluorescência emitida pela marcação foi medida por meio do citômetro de fluxo (Attune® Acoustic Focusing Cytometer, Thermo Fisher Scientific) e o perfil de células positivas para calreticulina foi analisado pelo Attune® Cytometer Software, Thermo Fisher Scientific.

3.8.2 Verificação da liberação de ATP

Para verificar a liberação de ATP pelas células tratadas, 1×10^5 células B16F10 foram plaqueadas em placa de 6 poços e incubadas a 37 °C por 24 horas sendo, após, transduzidas com um MOI de 500 dos vírus AdRGD-PG-eGFP, AdRGD-PG-p19^{Arf}, AdRGD-PG-IFN β , e de cada vetor da combinação AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β . O sobrenadante da cultura foi coletado para medição do ATP liberado e as células foram coletadas para extração de proteína e normalização da quantidade de ATP 72 horas após a transdução. Para a medição do ATP, foram utilizados 20 μ L do sobrenadante celular misturado à luciferina+luciferase, seguindo orientação do kit ENLITEN® ATP Assay System (Promega, Cat. N° FF2000) e a emissão de luz resultante da ação da luciferase na presença de luciferina e ATP foi verificada no leitor de microplacas VictorTm (Perkin-Elmer, Waltham, MA, EUA).

3.8.3 Verificação da liberação de HMGB1

Para verificar a liberação de HMGB1 pelas células tratadas, 1×10^5 células B16F10 foram plaqueadas em placa de 6 poços e incubadas a 37 °C por 24 horas sendo, após, transduzidas com um MOI de 500 dos vírus AdRGD-PG-eGFP, AdRGD-PG-p19^{Arf}, AdRGD-PG-IFN β , e de cada vetor da combinação AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β . O sobrenadante da cultura foi coletado para medição do HMGB1 liberado e as células foram coletadas para extração de proteína e normalização da quantidade de HMGB1 72 horas após a transdução. A medição de HMGB1 foi feita com o kit HMGB1 Elisa (IBL International, Cat. N° ST51011) seguindo orientação do fabricante e leitura espectrofotométrica a 450 nm.

3.9 Tratamento tumoral *in vivo* com os vetores adenovirais em um modelo animal utilizando camundongos imunocompetentes

O projeto foi apresentado para a COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP e encontra-se de acordo com os preceitos da Lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto no 6.899, de 15 de

julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo aprovado em 31/08/2015 (protocolo no 022/15).

Para o ensaio *in vivo*, 1×10^6 células B16F10 foram inoculadas (dia 0) no flanco esquerdo de camundongos C57Bl/6 e, após o tumor se tornar palpável (aproximadamente 10 dias), foram feitas 3 injeções intratumorais espaçadas por 48 horas de PBS 1 X (Mock) ou 5×10^8 unidades infectantes dos vetores AdRGD-PG-GFP, AdRGD-PG-p19^{Arf}, AdRGD-PG-IFN β , AdRGD-PG-IFN β + AdRGD-PG-p19^{Arf} ou AdRGD-PGIFN β^{IRES} p19^{Arf}, ou ainda 2 injeções de p19^{Arf} e a terceira injeção de IFN β (p19^{Arf} $\rightarrow$ IFN β) ou 2 injeções de IFN β sendo a terceira injeção de p19^{Arf} (IFN β $\rightarrow$ p19^{Arf}). As injeções foram dadas nos dias 11, 13 e 15 e as medições do tamanho tumoral foram realizadas a cada 2 dias até o dia 25 com o uso de um paquímetro. O volume tumoral foi calculado com a seguinte fórmula:

$$\text{Volume tumoral (mm}^3\text{)} = \frac{D \times d^2}{2}$$

Na qual, **D** é o tamanho do maior diâmetro tumoral em milímetros e **d** é o tamanho do menor diâmetro tumoral em milímetros. Quando um dos diâmetros tumorais atingiu aproximadamente 20 mm os camundongos foram eutanasiados com o uso de CO₂.

3.10 Ensaio para verificar o efeito parácrino de IFN β

Células B16F10 foram plaqueadas a 3×10^5 em placas de 6 cm e foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após, foram transduzidas separadamente com um MOI de 50 de cada vetor e, 24 horas após a transdução, foram contadas e replaqueadas a 1×10^5 por poço em placa de 6 poços misturando-se diferentes concentrações das células tratadas com os diferentes vetores. As misturas escolhidas para esse ensaio foram as seguintes: 90 % de células transduzidas com AdRGD-PG-eGFP + 10 % de células transduzidas com AdRGD-PG-IFN β ou AdRGD-PG-IFN β^{IRES} p19^{Arf}; 90 % de células transduzidas com AdRGD-PG-p19^{Arf} + 10 % de células transduzidas com AdRGD-PGIFN β ou AdRGD-PG-IFN β^{IRES} p19^{Arf}; e todos os controles correspondendo a 100 % de células transduzidas separadamente com os vetores AdRGD-PG-eGFP, AdRGD-PG-p19^{Arf},

AdRGD-PG-IFN β ou AdRGD-PG-IFN β^{IRES} p19^{Arf}. Após 60 horas da transdução, as células aderidas e em suspensão foram coletadas e fixadas em etanol 70 %, centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos a 4 °C, lavadas com PBS 1X e centrifugadas novamente. O sobrenadante foi descartado e as células tratadas com 1 μ L de iodeto de propídeo a 10 mg/mL durante 30 minutos a 37 °C. Após este período, as células foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 0,5 mL de PBS 1X. A fluorescência emitida pelo Iodeto de Propídeo foi medida por meio do citômetro de fluxo (Attune® Acoustic Focusing Cytometer, Thermo Fisher Scientific). O perfil de ciclo celular foi analisado pelo Attune® Cytometer Software, Thermo Fisher Scientific.

Alternativamente, células B16-ISRE-GFP-luc, que expressam GFP e luciferase sob o controle de um promotor que contém um *Interferon-Stimulated Response Element* (ISRE), foram plaqueadas a 1×10^5 em placa de 6 poços, transduzidas 24 horas após com um MOI de 500 dos vetores AdRGD-PG-GFP, AdRGD-CMV-lacZ ou AdRGD-PG-p19^{Arf} e, no dia seguinte à transdução, misturadas na proporção 9:1 com células que foram transduzidas da mesma forma com o vetor AdRGD-PG-IFN β . As células foram cultivadas dessa forma durante dois dias e coletadas em PFA 4 % para verificação da expressão de GFP por citometria de fluxo (Attune® Acoustic Focusing Cytometer, Thermo Fisher Scientific).

Para o ensaio *in vivo*, 1×10^6 células B16-ISRE-GFP-luc foram inoculadas (dia 0) no flanco esquerdo de camundongos C57Bl6 e, após o tumor se tornar palpável (aproximadamente 10 dias), foram feitas 3 injeções intratumorais espaçadas por 48 horas de 5×10^8 unidades infectantes dos vetores AdRGD-PG-GFP ou AdRGD-PG-IFN β . As injeções foram dadas nos dias 11, 13 e 15 e, no dia 16 os tumores foram coletados em RPMI 10 %, tratados com collagenase, dissociados e separados para fixação com PFA 4 % ou lise em RPMI contendo 35 μ g/mL de liberase (Cat N° 137503 – Roche) a 37 °C por 30 minutos. As células fixadas em PFA 4 % tiveram a expressão de GFP analisada por citometria de fluxo (Attune® Acoustic Focusing Cytometer, Thermo Fisher Scientific), enquanto que as células lisadas foram analisada para expressão de luciferase no leitor de microplacas VictorTm (Perkin-Elmer, Waltham, MA, EUA) na presença de luciferina (Promega, Cat. N° E2920).

3.11 Ensaio para verificar o perfil de expressão gênica

Células B16F10 foram plaqueadas a 8×10^5 em placas de 10 cm e transduzidas no dia seguinte como mostrado na **Tabela 1** abaixo:

Vetor adenoviral	MOI Total
Mock	0
AdRGD-PG-eGFP	400
AdRGD-PG-p19 ^{Arf}	200
AdRGD-PG-IFN β	200
AdRGD-PG-p19 ^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β	400 (200 de cada vetor)

Tabela 1: *Multiplicity of infection* (MOI) dos vetores utilizados em células B16F10 para posterior extração de RNA.

Para a transdução, foi utilizada uma quantidade de 4 mL de meio de cultura e, após 12 horas da transdução, o meio de cultura foi completado para 10 mL totais. Após 36 horas do início da transdução, o meio de cultura das placas foi descartado e adicionamos 2 mL de trizol por placa. Após verificar que havia ocorrido o descolamento das células, o trizol de cada placa foi transferido juntamente com as células para dois tubos de microcentrífuga (1 mL para cada tubo) e congelado a -80 °C até que fosse feita a extração do RNA.

3.11.1 Extração de RNA

Para a extração do RNA, adicionamos 200 μ L de clorofórmio em cada tubo contendo trizol, misturamos vigorosamente por 15 segundos e centrifugamos a mistura a 12000g por 15 minutos a 4 °C. Após, o sobrenadante contendo o RNA foi transferido para um novo tubo, no qual adicionamos 500 μ L de isopropanol e centrifugamos a 12000g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi vertido e o pellet de RNA foi lavado com 1 mL de etanol 75 % e centrifugado a 7500g por 5 minutos a 4 °C. Mais uma vez, o sobrenadante foi vertido e, após a secagem do RNA em temperatura ambiente, esse foi eluído em 44 μ L de água DEPC. Como a extração resultou em dois tubos de RNA

extraído de cada placa inicial de células, nesse momento juntamos o conteúdo dos dois tubos, totalizando 88 µL de RNA proveniente de cada placa.

3.11.2 Tratamento do RNA com DNase I e purificação

O tratamento do RNA com DNase I e a purificação seguiram o protocolo Rneasy Mini Handbook 09/2010 (Qiagen). Adicionamos à solução de RNA, 10 µL de Buffer RDD e 2,5 U de DNase I (Qiagen, Cat. Nº 79254) e a reação foi incubada a 20-25 °C por 10 minutos. Em seguida realizamos o protocolo de *RNA Cleanup* (Rneasy Mini Handbook 09/2010 – Qiagen). Ao final eluímos o RNA em 30 µL.

3.11.3 Verificação da integridade do RNA

A concentração do RNA total foi determinada por leitura de absorbância a 260nm no espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific, EUA). Para analisar a integridade do RNA no equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc), diluímos parte de todas as amostras de RNA 7 vezes para ter uma concentração compatível (25–500 ng/µL) para a análise da integridade e utilizamos o kit Agilent RNA 6000 Nano (Agilent Technologies, Cat. Nº 5067-1511) e seguimos o protocolo do fabricante.

3.11.4 Verificação da expressão gênica

Após verificar a integridade das amostras de RNA, a verificação da expressão gênica das amostras de células B16F10 tratadas com os diferentes vetores foi feita utilizando o GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST Array (Affymetrix, Cat. Nº 901171), seguindo a orientação do fabricante. O protocolo de preparação das amostras para hibridização no GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST Array (Affymetrix) envolve a utilização de outros kits. As etapas descritas a seguir foram realizadas com o Ambion® WT Expression Kit (Thermo Scientific, Cat. Nº 4411973): transcrição reversa a partir do RNA total gerando cDNA; transcrição *in vitro* a partir do cDNA gerando cRNA; purificação do cRNA amplificado durante a transcrição; reação com *random primers* para a criação de ssDNA (*single strain DNA*); tratamento com RNaseH para degradar o

RNA restante na reação de criação do ssDNA; purificação do ssDNA. A partir dessa etapa, é utilizado o Affymetrix GeneChip® WT Terminal Labeling and Hybridization Kit (Affymetrix, Cat. Nº 900671) para a fragmentação do ssDNA com a Uracil DNA Glycosylase (UDG) e com a Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1 (APE 1) que reconhece resíduos incomuns de dUTP incorporadas e quebra a fita de ssDNA; marcação do ssDNA fragmentado com biotina utilizando a Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) e finalmente a hibridização do ssDNA fragmentado e marcado com biotina ao GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST Array (Affymetrix). Após a hibridização, o chip é inserido na Affymetrix GeneChip Fluidics Station 450 para lavagem e, após, a leitura da quimioluminescência do chip é feita com o Affymetrix GCS 3000 7G scanner.

3.11.5 Análise estatística dos dados de expressão gênica

Os dados obtidos com essa técnica foram normalizados conjuntamente com o software Expression Console (Affymetrix), utilizando o algoritmo RMA e após a normalização os valores de expressão gênica foram submetidos à análise estatística através do programa TMEV. A princípio, foram filtrados 50 % dos genes que apresentaram a maior variância, seguido do teste SAM multi-classes com $FDR < 0,01$ %. Posteriormente esses genes foram submetidos ao teste SAM 2-classes, $FDR < 0,01$ %, a fim de identificar as diferenças específicas entre os grupos.

Para a análise funcional dos genes diferencialmente expressos e determinação das funções mais enriquecidas, foi utilizado o software DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*, v6.7) e os genes representados no GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST Array foram utilizados como background.

Uma rede de interação proteína-proteína foi construída a partir dos genes diferencialmente expressos, utilizando-se as bases de dados HPRD (*Human Protein Reference Database*), MINT (*The Molecular Interaction Database*) e IntAct (*The IntAct Molecular Interaction Database*). Para a construção da rede, foram utilizados a lista dos genes diferencialmente expressos mais os genes caracterizados como vizinhos diretos destes, ou seja, que interagem diretamente no nível proteico com os genes diferencialmente expressos, e as interações mais próximas, ou seja, os menores caminhos entre esses genes.

A partir da rede de interação proteica, composta pelos genes diferencialmente expressos mais seus vizinhos diretos, foram identificados os top 5 % genes *brokers* e *bridges*, de acordo com a metodologia descrita em (Cai *et al.*, 2010) e Hwang *et al.* (2008), respectivamente. Os genes *brokers* são basicamente os genes que apresentam um alto número de conexões com genes cujo número de conexões é baixo. Estes genes *brokers* teoricamente seriam indispensáveis, sem os quais a rede ficaria desconectada. Já os genes *bridges* são os genes que ligam duas ou mais regiões com alta conectividade, sem os quais não haveria o fluxo de informação entre essas regiões.

3.11.6 Validação da expressão gênica por PCR quantitativa

Para a validação da expressão dos genes identificados pelo *microarray*, nós utilizamos o método de PCR quantitativo. A partir de 2 ug do RNA total extraído, tratado com DNase I e purificado a partir das células B16F10 que foram transduzidas com os diferentes adenovírus, nós realizamos a reação de transcrição reversa utilizando *random primers* e a transcriptase reversa MMLV-RT (Invitrogen). Para a reação de PCR quantitativa, utilizamos os oligos descritos na **Tabela 2**.

As condições da reação foram como descrito: 100 ng de cDNA, 6 ou 12,5 pmol de cada primer, 10 µL de Syber Green PCR Master Mix (Invitrogen) em um volume final de 20 µL. As condições de amplificação utilizadas foram as seguintes: denaturação a 95 °C por 15 minutos, seguida por 40 ciclos de denaturação a 95 °C por 15 segundo, anelamento a 60 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto. Todas as amostras foram testadas em duplicata e analisadas pelo software 7500 Fast, versão 2.05 (Applied Biosystems). O método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ foi usado para a quantificação da expressão gênica e os dados foram analisados com o auxílio do software GraphPad Prisma versão 5.0, utilizando o teste de One-Way Analysis of Variance (não paramétrico), seguido de Mann-Whitney test.

Gene	Primer (5'>3')	
Tnfrsf1A	Forward primer	AGAGAAAGTGAGTGCCTCCC
	Reverse primer	TGTGACATTTGCAAGCGGAG
Bcl-2	Forward primer	CTGGTGGACAACATCGCCCTGTG
	Reverse primer	AGGTCCGATGCTGGGGCCATAT
p21^{Waf1}	Forward primer	TGGTGTCTGAGCGGCCTGAAGA
	Reverse primer	TCCCGTGGGCACTTCAGGGT
Mdm2	Forward primer	GGCCTCCAGGCCAATGTGCAA
	Reverse primer	TCGTTTTGCGCTCCAACGGACT
p53	Forward primer	GACAGCAGGGCTCACTCCAGCTAC
	Reverse primer	GGACGGGATGCAGAGGCAGTCA
Puma	Forward primer	GAGCGGCGGAGACAAGAAGAGC
	Reverse primer	AGGATCCCTGGGTAAGGGGAGGAG
B-actina	Forward primer	CAACGAGCGGTTCCGATG
	Reverse primer	GCCACAGGATTCCATACCCA
Mdh1	Forward primer	TGTCCCTGATGACCTGCTCT
	Reverse primer	CGGTCTCCTTTTCCTCGGTC
Nek6	Forward primer	AAGCCAGGCAAGACTGTGTC
	Reverse primer	CATCTGTGAGAGGTCACCCG
Nr3c1	Forward primer	AGGCCGCTCAGTGTTTTCTA
	Reverse primer	ATCCCGAAGCTTCATCGGAG
RanBP9	Forward primer	AGTTCAGCTACATCGGCCTC
	Reverse primer	CTGGTATTGGATGCGTGGCT
Sin3A	Forward primer	GCCCTGTCCTATCTTGACCAG
	Reverse primer	GGACACTCGGCTAATCACTCC
Tfap4	Forward primer	CATCCCGGCAAAATCTGGAC
	Reverse primer	TTCACGATAACTGCTCGCCT
Wdr46	Forward primer	TGGCGAAGATTCTGTGTCACC
	Reverse primer	GGAATGTCCCTCGCAAGTCAA
FoxO1	Forward primer	GCCCAACCAAAGCTTCCCA
	Reverse primer	TTTGGACTGCTCCTCAGTTCC
Mdm4	Forward primer	CACACTGCCTACCTCACGAC
	Reverse primer	TAGAAACCACCAAGGCAGGC
Phlda3	Forward primer	CGCCACATCTACTTCACGCT
	Reverse primer	CACAGTCTGGATGGCCTGTT
tp73 total	Forward primer	TGGTTGTGCCGTATGAACCC
	Reverse primer	AAGGATGGGCCTCCGATTCA
DNp73	Forward primer	GTGACCCCATGAGACACCTC
	Reverse primer	GGCACTGCTGAGCAAATTGA
Gapdh	Forward primer	CAGCAACTCCCACTCTTCC
	Reverse primer	CCATGTAGGCCATGAGGTTC

Tabela 2: Sequências dos oligos usados para as reações de PCR quantitativa.

3.12 Validação funcional dos genes superexpressos pelo tratamento de p19^{Arf} + IFN β em ensaio de silenciamento da expressão gênica

3.12.1 Silenciamento da expressão gênica por transfecção com siRNA

Os genes que foram validados pela PCR quantitativa como exclusivamente superexpressos após o tratamento das células B16F10 com os vetores AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β , em comparação com o uso desses vetores isolados, foram silenciados através duas transfecções de 50 nM do siRNA correspondente, como mostrado na **Tabela 3**, com Oligofectamine™ Transfection Reagent (Life Technologies, Cat. Nº 12252-011). Para isso, células B16F10 foram plaqueadas a 1×10^5 células por poço em placa de 6 poços e, no dia seguinte, transfectadas utilizando o seguinte protocolo: para cada poço, realizar uma mistura do siRNA + 175 μ L de meio Opti-MEM® I (Life Technologies, Cat. Nº 31985-088) sem soro em um tubo enquanto que em outro tubo misturar 4 μ L de oligofectamina + 11 μ L de Opti-MEM® I sem soro. Agitar levemente e, após 5 minutos de incubação na temperatura ambiente, misturar o conteúdo dos dois tubos. Após 20 minutos gotejar a mistura final nos poços contendo as células em 800 μ L de meio RPMI sem soro. Incubar as células a 37 °C em atmosfera úmida com 5 % de CO₂ por 4 horas e então adicionar 0,5 mL de meio RPMI contendo 30 % de FBS. Após 24 horas da primeira transfecção, repetimos o protocolo de transfecção e, após 2 horas da adição de 0,5 mL de RPMI 30 % FBS, o meio de cultivo celular foi retirado e as células foram transduzidas com um MOI de 500 de cada um dos vetores AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β em meio mínimo (700 μ L de RPMI + 10 % FBS). Após 72 horas, as células foram tripsinizadas e transferidas para tubo de 15 mL, juntamente com o meio no qual elas foram cultivadas e que contém células que poderiam ter se desprendido da placa. As células foram então centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram separadas em solução de etanol 70 % para análise do ciclo celular. Para a análise da expressão gênica e confirmação do silenciamento, realizamos esse mesmo protocolo, mas a coleta do RNA e congelamento a -80 °C em trizol foi realizada 36 horas após a transdução com os vetores.

siRNA	RNA alvo	Número de Catálogo
p73 siRNA	p73	Santa Cruz Biotech sc-36168
FKHR siRNA	FoxO1	Santa Cruz Biotech sc-35383
GR siRNA	Nr3c1	Santa Cruz Biotech sc-35506
PHLDA3 siRNA	Phlda3	Santa Cruz Biotech sc-152226
Ran BP-M siRNA	RanBP9	Santa Cruz Biotech sc-45590
WDR46 siRNA	Wdr46	Santa Cruz Biotech sc-155288
mSin3A siRNA	Sin3A	Santa Cruz Biotech sc-35974
Control siRNA-A	<i>Scramble</i>	Santa Cruz Biotech sc-37007
Control siRNA (Fluorescein Conjugate)-A	<i>Scramble</i>	Santa Cruz Biotech sc-36869

Tabela 3: siRNAs utilizados para os ensaios de silenciamento da expressão gênica, o RNA alvo para o silenciamento da expressão e a empresa da qual foi adquirido com o referente número de catálogo do produto.

3.12.2 Extração de RNA

Para a extração do RNA, adicionamos 200 µL de clorofórmio em cada tubo contendo trizol, misturamos vigorosamente por 15 segundos e centrifugamos a mistura a 12000 g por 15 minutos a 4 °C. Após, o sobrenadante contendo o RNA foi transferido para um novo tubo, no qual adicionamos 500 µL de isopropanol e centrifugamos a 12000 g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi vertido e o pellet de RNA foi lavado com 1 mL de etanol 75 % e centrifugado a 7500 g por 5 minutos a 4 °C. Mais uma vez, o sobrenadante foi vertido e, após a secagem do RNA em temperatura ambiente, esse foi eluído em 10 µL de água DEPC.

3.12.3 Verificação da integridade do RNA

A concentração do RNA total foi determinada por leitura de absorbância a 260 nm no espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific, EUA). A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1 % a 100 V por 20 minutos em TAE 1X e brometo de etídio (1 µg de brometo de etídeo por mL de gel). Posteriormente, a visualização do RNA foi realizada por exposição à luz UV. Os géis foram fotografados para análise utilizando-se câmera digital COHU High Performance CCD camera/Stratagene Eagle Eye II.

3.12.4 Validação do silenciamento da expressão gênica por PCR quantitativa

Para verificar o sucesso do silenciamento obtido após transfecção das células B16F10 com siRNA, na presença ou ausência da transdução com os vetores adenovirais, foram feitas reações de PCR quantitativa com os oligos de interesse, seguindo as mesmas condições aplicadas às reações de PCR quantitativa que foram utilizadas anteriormente para validar os resultados de expressão gênica obtidos pelo *microarray*.

3.12.5 Análise do perfil do ciclo de células B16F10 após o silenciamento da expressão gênica e tratamento com p19Arf + IFN β

As células coletadas e fixadas em etanol 70 % foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos a 4 °C, lavadas com PBS 1X e centrifugadas novamente. O sobrenadante foi descartado e as células tratadas com 1 μ L de iodeto de propídeo a 10 mg/mL durante 30 minutos a 37 °C. Após este período, as células foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 0,5 mL de PBS 1X. A fluorescência emitida pelo Iodeto de Propídeo foi medida por meio do citômetro de fluxo (Attune® Acoustic Focusing Cytometer, Thermo Fisher Scientific). O perfil de ciclo celular foi analisado pelo Attune® Cytometer Software, Thermo Fisher Scientific.

4 RESULTADOS

4.1 Células B16F10 tratadas *in vitro* com p19Arf + IFN β apresentam diminuição da viabilidade celular e inibição do crescimento

Uma vez que as células tratadas com os transgenes p19Arf e IFN β apresentaram uma modificação no perfil de ciclo celular, constatado em trabalhos anteriores, começamos o trabalho apresentado aqui com a verificação da viabilidade dessas células e o efeito dos vetores no crescimento celular. Dessa forma, as células transduzidas com os diferentes vetores AdRGD-PG-eGFP, AdRGD-PG-p19^{Arf}, AdRGD-PG-IFN β , AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β ou AdRGD-PG-IFN β ^{IRES}p19^{Arf} foram coradas com solução de MTT e contadas durante 3 ou 4 dias. A **Figura 3A** mostra a leitura de absorbância a 590 nm da coloração de MTT, indicando quanto maior for o valor de absorbância, maior é a incorporação do corante pelas células, evidenciando uma maior viabilidade celular. As células tratadas com a combinação gênica de p19Arf + IFN β têm uma viabilidade bastante menor em relação às células controle ou tratadas com GFP, e essa viabilidade também difere das células tratadas com os genes de p19Arf ou IFN β separados.

Além disso, na **Figura 3B** podemos notar que a proliferação celular é mais inibida quando as células são tratadas com p19Arf ou IFN β , em combinação ou isolados, do que quando tratadas com o vetor controle (GFP).

Figura 3: Células B16F10 tratadas com a combinação de p19Arf + IFN β apresentam menor viabilidade e crescimento *in vitro*. A viabilidade celular (A) é indicada por valores de absorvância a 590 nm de células B16F10 coradas com solução de MTT e a curva de crescimento (B) foi realizada por contagem após as células serem tratadas com os diferentes vetores AdRGD-PG-eGFP (GFP), AdRGD-PG-p19Arf (p19Arf), AdRGD-PG-IFN β (IFN β), AdRGD-PG-p19Arf + AdRGD-PG-IFN β (p19Arf + IFN β) ou AdRGD-PG-IFN β IRESp19Arf (IFN β IRESp19Arf). Os gráficos representam a média e desvio padrão de 3 experimentos independentes. A análise estatística foi feita com o teste de 2-way ANOVA, seguida por teste Bonferroni, *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001.

4.2 O tratamento de células B16F10 com p19Arf + IFN β induz a expressão de proteínas envolvidas com as vias de apoptose e necroptose

Uma vez que o tratamento de células B16F10 com AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β acarreta em efeitos melhores do que os tratamentos com os vetores individuais, buscamos entender quais os mecanismos de morte envolvidos nesse contexto. Dessa forma, realizamos ensaios para verificar a expressão de proteínas e a exposição/liberação de marcadores de morte pelas células.

Primeiramente, coletamos tanto as células aderidas na placa, quanto às células em suspensão, que possivelmente estavam em um processo de morte mais adiantado, 24, 48 e 72 horas após a transdução com os vetores e verificamos, como indicativo de apoptose, a exposição de fosfatidilserina pelas células, utilizando marcação com anexina-V conjugada a Alexa-488. Notamos que apenas o tratamento com a combinação de p19Arf + IFN β difere dos controles (B16F10 e lacZ) na indução da exposição de fosfatidilserina, indicando a ocorrência de apoptose (**Figura 4**). Além disso, nesse ensaio podemos supor que existe uma leve indução de apoptose também

após o tratamento das células B16F10 com p19Arf, uma vez que não houve diferença estatística entre esse tratamento e o tratamento com p19Arf + IFN β , no que se refere tanto às células viáveis, quanto às marcadas com annexina-V. No entanto, embora o tratamento com p19Arf aparente induzir a exposição de fosfatidilserina, também não houve diferença significativa entre esse tratamento e os controles. Com esse resultado, podemos observar que apesar de as células B16F10 estarem apresentando sinais de morte por apoptose, como a exposição de fosfatidilserina após a ação dos vetores, esse não é o fator que diferencia a morte resultante pelo tratamento combinado de AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β em comparação aos outros tratamentos.

Figura 4: Células B16F10 tratadas com a combinação de p19Arf + IFN β apresentam maior marcação para Annexina-V *in vitro*. Porcentagem de células viáveis (*viable*) ou marcadas com annexina-V (*Annexin*) 24 (A), 48 (B) e 72 horas (C) após serem tratadas com um MOI de 500 dos vetores AdRGD-CMV-lacZ (*lacZ*), AdRGD-PG-p19^{Arf} (*p19Arf*), AdRGD-PG-IFN β (*IFN β*) ou AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β (*p19Arf + IFN β*). O gráfico representa a média e desvio padrão de 3 experimentos independentes. A análise estatística foi feita com o teste Two-Way ANOVA, seguido por Bonferroni, **P<0,01 e ***P<0,001.

Esse resultado é corroborado com a análise da expressão de PARP-1 (*poly(ADP-ribose) polymerase-1*), uma proteína que é clivada por caspase-3 nos resíduos Asp214 e Gly215, gerando os fragmentos de 24 kDa e 89 kDa e indicando a ocorrência de apoptose. Na **Figura 5** é possível observar a proteína PARP-1 não clivada (116 kDa) e o fragmento de 89 kDa. Assim como no ensaio anterior, aqui podemos observar a forte presença de PARP-1 clivada após tratamento com p19Arf + IFN β , uma moderada presença após tratamento com p19Arf e uma leve presença após tratamento com IFN β .

Figura 5: Detecção de PARP-1 em extratos de células B16F10 resolvidos por SDS-PAGE e avaliados por Western blot. As células foram transduzidas com um MOI de 500 dos vetores adenovirais AdRGD-PG-eGFP (GFP), AdRGD-PG-p19^{Arf} (p19Arf), AdRGD-PG-IFN β (IFN β) ou AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β (p19 + IFN β) e coletadas e lisadas para a extração de proteína total após 8 ou 60 horas.

No entanto, através de um outro ensaio que mostra a atividade de caspase-3, o resultado obtido foi diferente. Para esse ensaio, nós estabelecemos através de transdução com um vetor lentiviral (gentilmente cedido por Chuan-Yuan Li, University of Colorado, EUA) e seleção com antibiótico puromicina, uma linhagem de B16F10 que expressa GFP e luciferase sob o controle do promotor constitutivo CMV (promotor derivado do citomegalovírus), denominada B16DEVD. Nesse modelo, essas proteínas estão fusionadas a um domínio de poliubiquitação, o que as torna suscetíveis à rápida degradação via proteassomo, mas existe um sítio de clivagem por caspase-3 (denominado DEVD) entre o sítio de poliubiquitinação e o domínio de GFP-luciferase, o que faz a proteína repórter se tornar estável apenas quando as caspase-3 está ativa na célula (**Figura 6**) (Huang *et al.*, 2011).

Figura 6: Representação esquemática de um repórter de caspase-3 baseado na atividade de proteassomo (adaptado de Huang et al., 2011).

Nesse modelo, podemos observar que a detecção da atividade de luciferase é possível apenas após o tratamento com o transgene p19Arf (**Figura 7**). Isso nos leva a pensar que existem outras vias de morte sendo ativadas nas células tratadas com IFN β ou com a combinação de p19Arf + IFN β ao invés da via de apoptose típica que culmina na ativação de caspase-3.

Figura 7: Células B16F10 tratadas com p19Arf apresentam aumento da ativação de caspase-3 *in vitro*. Atividade de luciferase do repórter de caspase-3 em células B16DEVD 48 horas após serem transduzidas com um MOI de 500 dos vetores AdRGD-PG-eGFP (GFP), AdRGD-PG-p19^{Arf} (Arf), AdRGD-PG-IFN β (IFN β) ou AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β (p19Arf + IFN β). O gráfico representa a média e desvio padrão de 3 experimentos independentes. A análise estatística foi feita com o teste One-Way ANOVA, seguido por teste de comparação múltipla de Tukey, ***P<0,001.

Além disso, através de um ensaio de inibição global de caspases, observamos que os tratamentos das células B16F10 com o inibidor Z-VAD-FMK não bloqueia a morte celular causada pelos vetores AdRGD-PG-p19^{Arf}, AdRGD-PG-IFN β ou AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β (**Figura 8**). Dessa forma podemos concluir que, apesar da ativação de caspases estar aparentemente presente no tratamento de células B16F10 com os vetores, como mostrado pela clivagem de PARP principalmente nas células tratadas com p19Arf + IFN β e pela expressão de luciferase nas células tratadas com p19Arf, essa morte não é dependente exclusivamente de caspase. Esse ensaio reforça a ideia de que existem outros mecanismos de morte envolvidos no tratamento de células B16F10 com a combinação de p19Arf + IFN β .

Figura 8: Z-VAD-FMK não inibe a morte de células B16F10 tratadas com os vetores *in vitro*. Células B16F10 foram tratadas com 50 μ M de Z-VAD-FMK (ZV) 4 horas antes ou após serem transduzidas com um MOI de 500 dos vetores AdRGD-PG-eGFP (GFP), AdRGD-PG-p19^{Arf} (Arf), AdRGD-PG-IFN β (IFN β), AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β (p19Arf + IFN β) ou tratadas com 1 μ M de doxorrubicina (Dox). As células foram coletadas 72 horas após a transdução ou 16 horas após o tratamento com Dox. O gráfico representa a média e desvio padrão de 3 experimentos independentes. A análise estatística foi feita com o teste One-Way ANOVA, seguido por teste de comparação múltipla de Tukey, ***P<0,001.

A fim de verificar a expressão de proteínas envolvidas em outras vias de morte, tais como a necroptose e autofagia, verificamos a expressão de proteínas reconhecidas por estarem envolvidas nessas vias. Sabe-se que a necrose programada é mediada pela expressão de RIPK3 (*receptor interacting protein kinase-3*) e seu substrato MLKL

(*mixed lineage kinase like*) (Vandenabeele *et al.*, 2010). Dessa forma, verificamos a expressão de RIPK3 por western blot (**Figura 9**) e observamos que apenas o tratamento com os vetores p19Arf + IFN β é capaz de induzir altos níveis de expressão de RIPK3.

Figura 9: Detecção de RIPK3 em extratos de células B16F10 resolvidos por SDS-PAGE e avaliados por Western blot. As células foram transduzidas com um MOI de 500 dos vetores adenovirais AdRGD-PG-eGFP (GFP), AdRGD-PG-p19^{Arf} (p19Arf), AdRGD-PG-IFN β (IFN β) ou AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β (p19 + IFN β) e coletadas e lisadas para a extração de proteína total após 36 horas.

É importante salientar que a sinalização por TNF (*tumor necrosis factor*), uma citocina pleiotrópica que possui grande papel na inflamação induzida por infecções ou dano no tecido, ocorre principalmente através do receptor 1 (TNFR1/TNFRSF1A) e causa a indução de muitos genes, inclusive RIPK3, sendo um regulador essencial da necrose mediada por TNF (Zhang *et al.*, 2009). Como visto por qPCR, houve um aumento da expressão de TNFR1 apenas em células tratadas pela combinação de AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β (**Figura 10**), condizente com a indução de RIPK3.

Figura 10: PCR quantitativa do mRNA do gene TNFRSF1A evidenciando sua superexpressão na presença da combinação de p19Arf + IFNβ em comparação com as outras condições. O RNA total extraído de células B16F10 foi usado para a reação de transcrição reversa e PCR quantitativa. A média da expressão dos genes de β-actina e Gapdh foi usada como referência. Os dados representam a média e desvio padrão de reações de PCR quantitativa de 5 experimentos independentes. A análise estatística foi feita com o teste One-Way Analysis of Variance, seguido por teste Mann-Whitney, *P<0,05 e **P<0,01.

Por fim, para verificar a ocorrência de autofagia celular após o tratamento combinado de p19Arf + IFNβ, realizamos western blot para detectar a expressão da proteína LC3-II (*light chain 3-II*) nas células. Na **Figura 11**, observamos que há uma diminuição na expressão de LC3-II nas células tratadas com p19Arf ou IFNβ após 60 horas, sendo esses níveis ainda menores após o tratamento com p19Arf + IFNβ.

Figura 11: Detecção de LC3β em extratos de células B16F10 resolvidos por SDS-PAGE e avaliados por Western blot. As células foram transduzidas com um MOI de 500 dos vetores adenovirais AdRGD-PG-eGFP (GFP), AdRGD-PG-p19^{Arf} (p19Arf), AdRGD-PG-IFNβ (IFNβ) ou AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFNβ (p19 + IFNβ) e coletadas e lisadas para a extração de proteína total após 8 ou 60 horas.

4.3 Células B16F10 tratadas com p19Arf + IFN β liberam fatores imunogênicos durante a morte

A morte celular classificada como imunogênica é associada a mudanças na estrutura da membrana celular e liberação de fatores ao meio extracelular que induzem uma resposta imune no paciente. Para distinguir a morte celular imunogênica da não imunogênica, são definidos 3 parâmetros: a exposição de calreticulina na membrana das células, a secreção de ATP por vesículas autofágicas e a liberação de HMGB1 (*nonhistone chromatin protein high-mobility group box 1*).

Verificamos que há um aumento da exposição de calreticulina após o tratamento de células B16F10 com os vetores p19Arf ou IFN β e que essa exposição é ainda superior após o tratamento combinado de p19Arf + IFN β (**Figura 12A**). Além disso, verificamos que ocorre uma maior liberação de ATP apenas quando as células são tratadas com a combinação dos vetores em comparação com os outros tratamentos (**Figura 12B**) e, por fim, que a liberação de HMGB1 ocorre apenas após o tratamento combinado de p19Arf + IFN β , em comparação com o tratamento com GFP (**Figura 12C**).

Figura 12: Exposição/liberação de fatores de morte imunogênica pelas células B16F10 transduzidas com os diferentes vetores. Células B16F10 foram plaqueadas a 1×10^5 em placa de 6 poços e, no dia seguinte, transduzidas com MOI de 500 dos vetores AdRGD-PG-eGFP (GFP), AdRGD-PG-p19^{Arf} (p19Arf), AdRGD-PG-IFN β (IFN β) ou AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β (p19Arf + IFN β), sendo que 72 horas após a transdução, o sobrenadante da cultura celular foi coletado para medição do ATP ou HMGB1 liberado e as células foram lisadas para extração de proteína total e quantificação para posterior normalização do resultado ou marcadas com anticorpo contra calreticulina. A análise estatística foi feita com o teste de One-way ANOVA, seguido por Tukey's Multiple Comparison Test, *P<0,05 e ***P<0,001.

4.4 Tratamento de tumores de células B16F10 *in vivo* com IFN β acarreta na inibição do crescimento tumoral e aumento da sobrevida de camundongos C57Bl/6

A fim de verificar a ação dos vetores em um modelo tumoral *in vivo*, foram inoculadas subcutaneamente 1×10^6 células B16F10 no flanco esquerdo de camundongos C57Bl/6 e, após o tumor se tornar palpável (aproximadamente 10 dias), o tratamento com os vetores adenovirais se deu início. O tratamento consistiu de 3 injeções de 5×10^8 partículas infectantes de adenovírus espaçadas por 48 horas. A partir disso foi possível observar, na **Figura 13**, que os tratamentos que continham os transgenes de p19Arf + IFN β ou então o tratamento utilizando apenas IFN β foram os mais eficazes em manter o volume tumoral pequeno, indicando que o principal componente para a eficácia do tratamento *in vivo* pode ser o IFN β , no que se refere à inibição do crescimento tumoral e aumento da sobrevida dos camundongos. É importante lembrar que a combinação de p19Arf + IFN β é melhor em induzir morte celular, inibição do crescimento e diminuição da viabilidade celular *in vitro*, como verificado anteriormente. Dessa forma, ainda é necessária uma análise mais refinada em relação aos efeitos dos transgenes sobre as células B16F10, como será descrito a diante.

Além disso, para verificar a sensibilização das células B16F10 por p19Arf para a morte causada pelo efeito parácrino de IFN β *in vivo*, nesse mesmo ensaio foram feitos dois tratamentos diferenciados. Em um deles, os tumores foram tratados com 2 injeções de p19Arf e a terceira injeção de IFN β (p19Arf $\rightarrow$ IFN β), enquanto que no outro tratamento, os tumores receberam 2 injeções de IFN β sendo a terceira injeção de p19Arf (IFN β $\rightarrow$ p19Arf). Com isso, gostaríamos de verificar se a morte das células seria mais acentuada se elas fossem transduzidas com p19Arf antes ou após receberem IFN β . Como é observado na **Figura 13**, todos os tratamentos que foram iniciados com IFN β , sendo sozinho ou em combinação com p19Arf, foram eficazes em impedir a progressão tumoral. Este resultado aponta que, *in vivo*, a presença de IFN β é crítica para retardar o crescimento tumoral e que os efeitos de p19Arf podem ser limitados.

A

B

Figura 13: Tratamento *in vivo* em um modelo tumoral em camundongos imunocompetentes C57Bl/6. (A) Curva de crescimento tumoral de células B16F10 inoculadas no flanco esquerdo de camundongos e tratadas com 3 injeções intratumorais de AdRGD-PG-eGFP (GFP), AdRGD-PG-p19^{Arf} (p19Arf), AdRGD-PG-IFN β (IFN β), AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β (p19Arf+IFN β), AdRGD-PGIFN β IRESp19^{Arf} (IFN β IRESp19Arf) ou 2 injeções de AdRGD-PGp19^{Arf} e a terceira injeção de AdRGD-PGIFN β (p19Arf $\rightarrow$ IFN β) ou 2 injeções de AdRGD-PG-IFN β e a terceira injeção de AdRGD-PGp19^{Arf} (IFN β $\rightarrow$ p19Arf) e (B) curva de sobrevivência desses mesmos camundongos. A análise estatística foi feita com o teste de 2-way ANOVA, seguida por teste Bonferroni em (A) e curva de Kaplan-Meier em (B). ***P<0,001.

4.5 Efeito parácrino de IFN β atinge células vizinhas às transduzidas acarretando em um aumento dos efeitos antitumorais de IFN β

Como forma de comprovar a existência do efeito parácrino de IFN β no tratamento em questão e sua ação sobre células vizinhas que são previamente transduzidas ou não com o vetor AdRGD-PG-p19^{Arf}, realizamos um ensaio no qual as células B16F10 foram transduzidas separadamente com cada vetor e, 24 horas após a transdução, foram contadas e replaqueadas misturando-se diferentes concentrações das células tratadas com os diferentes vetores. As células foram misturadas nas proporções 9:1 da seguinte forma: 90 % de células transduzidas com AdRGD-PG-eGFP ou AdRGD-PG-p19^{Arf} + 10 % de células transduzidas com AdRGD-PG-IFN β ou AdRGD-PG-IFN β ^{IRES}p19^{Arf}; além de todos os controles constituídos de 100 % de células transduzidas separadamente com os vetores AdRGD-PG-eGFP, AdRGD-PG-p19^{Arf}, AdRGD-PG-IFN β ou AdRGD-PG-IFN β ^{IRES}p19^{Arf}. O resultado é observado na **Figura 14A**, na qual nota-se que quando há 100 % de células transduzidas com AdRGD-PG-IFN β , a porcentagem de células hipodiploides chega a aproximadamente 55 % e quando há apenas 10 % de células expressando e secretando IFN β os níveis de células hipodiploides chegam a aproximadamente 45 %, mostrando o possível efeito dessa proteína secretada para as células vizinhas. Quando 90 % das células são transduzidas com AdRGD-PG-p19^{Arf} ou AdRGD-PG-IFN β ^{IRES}p19^{Arf} e cultivadas com apenas 10 % de células expressando e secretando IFN β , os níveis de células hipodiploides chegam a aproximadamente 70 %, mostrando que as células tratadas com p19^{Arf} se tornam sensíveis à morte por IFN β .

Além disso, o efeito parácrino de IFN β foi evidenciado por um ensaio com células B16F10-ISRE-GFP-luc, que expressam GFP e luciferase sob o controle de um promotor que contém um ISRE (*Interferon-Stimulated Response Element*). Dessa forma, tanto as células transduzidas com o AdRGD-PG-IFN β , quanto as células que recebem o IFN β secretado pelas células transduzidas, expressam GFP. Como observado na **Figura 14B**, quando há a mistura de células transduzidas com o AdRGD-PG-IFN β com células não transduzidas, na proporção 1:9, observamos o mesmo nível de expressão de GFP das células transduzidas com o AdRGD-PG-IFN β apenas (em torno de 50 %). Com o MOI de 500 do vetor AdRGD-PG-eGFP, observamos transdução de aproximadamente 90 % das células. Podemos supor que a transdução com AdRGD-PG-

IFN β também atinge esses níveis, mas isso acarreta em apenas 50 % de células expressando GFP, possivelmente pelo fato de o promotor que contém o elemento ISRE ser mais fraco que o promotor responsivo à p53 (que contém o elemento PG) e aparentar uma expressão menor. Além disso, acreditamos que a porcentagem de células que expressam GFP na condição 90 % p19Arf + 10 % IFN β se mostrou ser menor que 50 %, pois nessa condição as células já sofrem pela ação combinada dos transgenes e começam a morrer. Também é importante notar com esse experimento, que a transdução com AdRGD-PG-p19^{Arf} não acarreta na indução do promotor que contém o ISRE, mostrando a especificidade do ISRE.

Figura 14: Efeito parácrino de IFN β é evidenciado *in vitro*. Porcentagem de células B16F10 hipodiploides após serem tratadas com os vetores e misturadas em diferentes proporções (A) e células B16F10-ISRE-GFP-luc expressando GFP após tratamento com AdRGD-PG-IFN β e mistura com células não transduzidas ou transduzidas com outros vetores. AdRGD-PG-eGFP (GFP), AdRGD-PG-p19^{Arf} (p19Arf), AdRGD-PG-IFN β (IFN β), AdRGD-PGIFN β RESp19^{Arf} (IFN β RESp19Arf), 90 % PBS + 10 % IFN β (mistura de 90 % de células não transduzidas + 10 % de células transduzidas com AdRGD-PG-IFN β) e 90 % p19Arf + 10 % IFN β (mistura de 90 % de células transduzidas com AdRGD-PG-p19^{Arf} + 10 % de células transduzidas com AdRGD-PG-IFN β). O gráfico representa a média e desvio padrão de 3 experimentos independentes. A análise estatística foi feita com o teste de One-way ANOVA, seguida por Tukey's Multiple Comparison Test, *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001.

O efeito parácrino de IFN β é também evidenciado com o uso do promotor contendo o ISRE em um ensaio *in vivo*. Nesse ensaio, observamos que, embora as 3 injeções com 5×10^8 partículas infectantes do vetor AdRGD-PG-eGFP transduzam apenas 50 % das células B16F10-ISRE-GFP-luc inoculadas no flanco esquerdo de camundongos C57Bl/6, quando utilizamos o vetor AdRGD-PG-IFN β , o efeito parácrino de IFN β é capaz de atingir aproximadamente 70 % das células tumorais (**Figura 15A**). Como forma de diferenciar a expressão de GFP proveniente do vetor AdRGD-PG-eGFP da expressão proveniente das células B16F10-ISRE-GFP-luc, coletamos o tumor um dia após a última injeção e analisamos a expressão de luciferase por essas células. Com essa análise, podemos notar que o vetor AdRGD-PG-eGFP não induz expressão a partir do ISRE, expressando apenas 100 unidades arbitrárias de luciferase, enquanto que o vetor AdRGD-PG-IFN β promove aproximadamente a expressão de 500 unidades arbitrárias de luciferase (**Figura 15B**).

Figura 15: Efeito parácrino de IFN β é evidenciado *in vivo*. Porcentagem de células tumorais B16F10-ISRE-GFP-luc expressando GFP (A) ou medição da sua atividade de luciferase (B) após tratamento com injeção *in situ* de AdRGD-PG-eGFP ou AdRGD-PG-IFN β . Células B16F10-ISRE-GFP-luc foram inoculadas a 1×10^6 no flanco esquerdo de camundongos C57Bl/6 e, após o tumor se tornar palpável, foram inoculadas 5×10^8 partículas infectantes dos vetores em 3 injeções espaçadas por um dia. No dia seguinte à última injeção, o tumor foi coletado, dissociado e fixado em PFA 4 % para análise da expressão de GFP ou lisado para análise da expressão de luciferase. AdRGD-PG-eGFP (GFP) e AdRGD-PGIFN β (IFN β). A análise estatística foi feita com teste-t, *P<0,05.

4.6 Análise da expressão gênica de células B16F10 tratadas com AdRGD-PG-p19Arf e/ou AdRGD-PG-IFN β

O tratamento combinado de p19Arf + IFN β é superior ao uso dos vetores isolados em induzir morte celular e inibir o crescimento e viabilidade celular *in vitro*. No entanto, esse tratamento não se mostrou superior *in vivo*, sendo o tratamento com IFN β suficiente para inibir o crescimento tumoral e aumentar a sobrevivência dos camundongos. Como citado anteriormente, acreditamos que os efeitos do IFN β *in vivo*, são estendidos devido ao seu efeito parácrino e ativação do sistema imunológico do hospedeiro, mas ainda sabendo da importância de p19Arf em induzir a morte das células tratadas *in vitro*, é importante investigar quais são os mecanismos moleculares ativados no contexto intracelular que acarretam em níveis superiores de morte de células quando tratadas com p19Arf + IFN β .

Para aprofundar nosso entendimento desses mecanismos, a expressão gênica global das células tratadas com os diferentes vetores foi analisada com o uso da plataforma GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST Array (Affymetrix). Nesse experimento, células B16F10 foram tratadas com um MOI de 200 de cada vetor monocistônico (AdRGD-PG-p19^{Arf} ou AdRGD-PG-IFN β) ou um total de 400 no caso das células que foram transduzidas com a combinação de AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β , sendo 200 de cada vetor. Nesse ensaio optamos por utilizar a combinação dos dois vetores monocistônicos em comparação com o uso desses vetores isolados, ao invés de utilizar o vetor bicistônico AdRGD-PG-IFN β^{IRES} -p19^{Arf}, pois dessa forma a expressão dos transgenes e o mecanismo de ação dos vetores seriam iguais nas condições em que fossem usados isoladamente e na condição na qual é feita a combinação dos transgenes. Se ao invés disso, nós tivéssemos utilizado o vetor bicistônico, estaríamos introduzindo um novo vetor no contexto que, por mais que induza os mesmos níveis de morte que a combinação de AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β , sua cinética de expressão e mecanismo de ação podem ser diferentes. Por fim, para igualar a quantidade de partículas infecciosas totais utilizadas, levando em consideração o montante de vírus utilizado na condição AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β , transduzimos a placa controle com um MOI de 400 do vírus AdRGD-PG-eGFP.

Esse experimento foi realizado 7 vezes e o RNA total foi extraído e purificado 36 horas após a transdução com os vetores e sua integridade foi verificada através do

Agilent 2100 Bioanalyzer. Para a análise da expressão gênica, foram utilizadas as amostras que apresentaram RIN (*RNA Integrity Number*) superior a 8. Na **Figura 16**, observa-se que a integridade das amostras está nos padrões desejados, exceto pelas amostras 5 e 25. Dessa forma, as análises foram realizadas com as amostras do experimento 2 (amostras 6 a 9), experimento 3 (amostras 10 a 13), experimento 4 (amostras 15 a 17) e experimento 5 (amostras 18 a 20).

Figura 16: Perfil da integridade das amostras de RNA total. Amostras: 1) Padrão de RNA; 2 a 5) B16F10 tratada com AdRGD-PG-GFP, AdRGD-PG-p19^{Arf}, AdRGD-PG-IFN β ou AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β (Experimento 1); 6 a 9) B16F10 tratada com AdRGD-PG-GFP, AdRGD-PG-p19^{Arf}, AdRGD-PG-IFN β ou AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β (Experimento 2); 10 a 13) B16F10 tratada com AdRGD-PG-GFP, AdRGD-PG-p19^{Arf}, AdRGD-PG-IFN β ou AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β (Experimento 3); 14) Padrão de RNA; 15 a 17) B16F10 tratada com AdRGD-PG-p19^{Arf}, AdRGD-PG-IFN β ou AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β (Experimento 4); 18 a 20) B16F10 tratada com AdRGD-PG-p19^{Arf}, AdRGD-PG-IFN β ou AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β (Experimento 5); 21 a 23) B16F10 tratada com AdRGD-PG-p19^{Arf}, AdRGD-PG-IFN β ou AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β (Experimento 6); 24 a 26) B16F10 tratada com AdRGD-PG-p19^{Arf}, AdRGD-PG-IFN β ou AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β (Experimento 7).

A expressão gênica das amostras foi analisada e normalizada e os controles de qualidade do GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST Array (Affymetrix) foram verificados. A partir desses dados, foi feita uma análise estatística comparando os quatro tratamentos (GFP, p19Arf, IFN β ou p19Arf + IFN β , sendo n=4 para cada tratamento) com o método de SAM multi-classes FDR < 0,01 % e 1000 permutações. Esse método resultou em 2946 genes diferencialmente expressos entre os tratamentos, no entanto sem indicar quais genes são modulados especificamente por quais tratamentos. Para identificar a ação de cada tratamento isolado no perfil de expressão gênica, realizamos um teste estatístico com o método de SAM 2-classes FDR < 0,01 % com somente permutações únicas. Com isso identificamos os genes mais regulados em um tratamento *versus* outro

tratamento (**Tabela 4**) como, por exemplo, no caso da comparação dos tratamentos GFP x p19Arf, na qual existem 1338 genes diferencialmente regulados por p19Arf em comparação a GFP. Desses genes, 874 são mais expressos e 464 genes são menos expressos quando a célula é tratada com p19Arf em comparação ao tratamento com GFP.

Comparação (SAM 2-classes FDR < 0,01 %)	Número total de genes regulados	Número de genes mais expressos	Número de genes menos expressos
GFP x p19Arf	1338	874	464
GFP x IFN β	971	467	504
GFP x COMBO	2754	1473	1281
p19Arf x COMBO	586	488	98
IFN β x COMBO	2140	1246	894
p19Arf x IFN β	539	0	539

Tabela 4: Número de genes regulados (mais ou menos expressos) por um tratamento em comparação a outro. Tratamentos: AdRGD-PG-eGFP (GFP), AdRGD-PG-p19^{Arf} (Arf), AdRGD-PG-IFN β (IFN β) ou AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β (COMBO).

A partir desse resultado, nós utilizamos o diagrama de Venn para determinar quais eram os genes modulados apenas pela combinação gênica de p19Arf + IFN β (COMBO). Nós construímos o diagrama de Venn com as seguintes comparações: GFP *versus* p19Arf, GFP *versus* IFN β e GFP *versus* COMBO (**Figura 17**). Com esse diagrama, conseguimos distinguir 397 genes que são mais expressos e 657 genes que são menos expressos exclusivamente pelo tratamento combinado de p19Arf + IFN β em comparação com o tratamento controle (GFP).

Figura 17: Diagrama de Venn com os genes mais expressos e menos expressos identificados através da comparação entre os diferentes tratamentos. Existem 397 genes que são mais expressos apenas quando as células B16F10 são tratadas com a combinação de p19Arf + IFN β (COMBO) e 657 genes menos expressos exclusivamente na mesma condição.

A partir da lista de 1054 genes regulados apenas pelo tratamento combinado de p19Arf + IFN β e utilizando o software DAVID, determinamos as funções mais representadas dentre esses genes, ou seja, as funções mais enriquecidas por esse tratamento. Dentre as funções mais enriquecidas representadas pelos genes mais expressos pelo tratamento combinado estão: regulação da transcrição; apoptose/morte celular; resposta celular a stress/resposta a dano no DNA/reparo de DNA; ativação de linfócitos/diferenciação de células T/ativação de leucócitos; e regulação negativa do crescimento celular.

Já as funções mais enriquecidas pelos genes menos expressos pelo tratamento combinado estão relacionadas com: ciclo celular/mitose/divisão celular; organização/regulação da cromatina; mitocôndria/membrana mitocondrial interna; respiração celular aeróbia; retículo endoplasmático; adesão celular/junção de aderência; organização do citoesqueleto; pigmentação celular/metabolismo de melanina; e homeostase celular.

Com o auxílio do software Cytoscape 2.8.3, montamos as redes de interação proteína-proteína das funções reguladas pelo tratamento combinado de p19Arf + IFN β e que consideramos mais importantes. Podemos notar, pela complexidade das redes gênicas, que a função de ciclo celular (**Anexo A**) parece ser a função mais regulada pelo

tratamento combinado de p19Arf + IFN β , ou seja, que possui o maior número de genes, porém essa função não é regulada exclusivamente pela combinação de p19Arf + IFN β , mas também por esses genes isolados. Além disso, as funções de ativação do sistema imune (**Anexo B**), reparo de DNA (**Anexo C**), apoptose e morte celular (**Anexo D**), adesão celular (**Anexo E**), modelamento e organização da cromatina (**Anexo F**), transcrição gênica (**Anexo G**) e respiração celular (**Anexo H**) são também bastante importantes e reguladas pelos genes isolados bem como pela combinação de p19Arf + IFN β . Algumas dessas funções corroboram o que podemos observar *in vitro* com o tratamento de células B16F10 com os vetores p19Arf + IFN β , uma vez que as células tratadas apresentam parada do ciclo celular e diminuição da viabilidade e morte celular por apoptose, por exemplo.

Uma vez que o tratamento combinado de p19Arf + IFN β modula exclusivamente um grande número de genes (1054 genes) e esses genes modulados interagem com muitos outros genes no nível proteico, utilizamos o conceito de genes *brokers* e *bridges* para identificar quais são os genes mais importantes e talvez imprescindíveis para a eficácia do tratamento combinado em células B16F10. Essa análise foi realizada com o auxílio do aluno de doutorado Daniel Gomes Ferrari do Laboratório de Computação Natural (LCoN), Universidade Presbiteriana Mackenzie. Na **Figura 18** (e **Anexo I**), observamos os genes mais expressos regulados exclusivamente pela combinação de p19Arf + IFN β relacionados à função de morte celular e apoptose. É notável a importância dos genes de p53, Prkcd, Phlda3, Nr3c1 e Notch1 como genes *brokers* dessa função. Entre os genes relacionados com o reparo de DNA (**Figura 19 e Anexo J**), observamos mais uma vez que os genes de p53 e Phlda3 são bastante importantes como *brokers* dessa função, juntamente com os genes de tp73, Mpg e Babam1. Já na função de regulação da transcrição gênica (**Figura 20 e Anexo K**), encontramos os genes de Smad2, Smad7 e Smad8, Tnfrsf1A, Notch1, p53, Nr3c1 entre outros como genes *brokers*, evidenciando a redundância entre as funções ativadas pela combinação de p19Arf + IFN β . Os genes presentes em cada rede são representados por diferentes formatos e cores dependendo da sua função de *brokers* ou *bridges*, como descrito na legenda de cada figura de rede.

Figura 18: Rede de interação proteína-proteína dos genes mais expressos pelo tratamento combinado de p19Arf + IFN β e relacionados à função de morte celular e apoptose. Formato de losango = genes *brokers*; formato de V = genes *bridges*; formato quadrado = sem função específica; coloração vermelha = genes upregulados exclusivamente pela combinação p19Arf + IFN β ; coloração cinza = sem alteração na expressão gênica.

Figura 19: Rede de interação proteína-proteína dos genes mais expressos pelo tratamento combinado de p19Arf + IFN β e relacionados à função de reparo de DNA. Formato de losango = genes *brokers*; formato de V = genes *bridges*; formato quadrado = sem função específica; coloração vermelha = genes upregulados exclusivamente pela combinação p19Arf + IFN β ; coloração cinza = sem alteração na expressão gênica.

Figura 20: Rede de interação proteína-proteína dos genes mais expressos pelo tratamento combinado de p19Arf + IFN β e relacionados à função de regulação da transcrição gênica. Formato de losango = genes *brokers*; formato de V = genes *bridges*; formato quadrado = sem função específica; coloração vermelha = genes upregulados exclusivamente pela combinação p19Arf + IFN β ; coloração cinza = sem alteração na expressão gênica.

Entre os genes regulados exclusiva e negativamente pela combinação de p19Arf + IFN β estão genes envolvidos na regulação do metabolismo celular (**Figura 21 e Anexo O**), modificação da cromatina (**Figura 22 e Anexo P**) e genes responsáveis pela respiração celular (**Figura 23 e Anexo Q**), ganhando destaque os genes de, Bcl2, Akt1, Cbx1, Myc, Aldh5A e Sod2.

Figura 21: Rede de interação proteína-proteína dos genes menos expressos pelo tratamento combinado de p19Arf + IFN β e relacionados à função de regulação do metabolismo celular. Formato de losango = genes brokers; formato de V = genes bridges; formato quadrado = sem função específica; coloração verde = genes downregulados exclusivamente pela combinação p19Arf + IFN β ; coloração cinza = sem alteração na expressão gênica.

Figura 22: Rede de interação proteína-proteína dos genes menos expressos pelo tratamento combinado de p19Arf + IFN β e relacionados à função de modificação da cromatina. Formato de losango = genes *brokers*; formato de V = genes *bridges*; formato quadrado = sem função específica; coloração verde = genes downregulados exclusivamente pela combinação p19Arf + IFN β ; coloração cinza = sem alteração na expressão gênica.

Figura 23: Rede de interação proteína-proteína dos genes menos expressos pelo tratamento combinado de p19Arf + IFN β e relacionados à função de respiração celular. Formato de losango = genes *brokers*; formato de V = genes *bridges*; formato quadrado = sem função específica; coloração verde = genes downregulados exclusivamente pela combinação p19Arf + IFN β ; coloração cinza = sem alteração na expressão gênica.

Nós utilizamos o método de PCR quantitativa para investigar o nível de expressão de alguns genes centrais presentes nas redes gênicas das funções enriquecidas pelo tratamento combinado de p19^{Arf} + IFN β . Escolhemos validar primeiramente os genes diretamente relacionados à via de p19^{Arf}/MDM2/p53, uma vez que essa via gênica é central para a eficácia do tratamento com os vetores adenovirais. É notável a superexpressão dos genes de p53, p21^{Waf1}, Mdm2 e Puma (**Figura 24**) com o tratamento combinado em comparação com qualquer outra condição. Também é possível observar uma diferença de expressão desses genes comparando-se o tratamento dos genes combinados com o tratamento utilizando os genes isolados e os controles (B16F10 ou B16F10 transduzida com o vetor AdRGD-PG-eGFP). Principalmente no que se refere à expressão de p53, é muito interessante notar que não apenas o tratamento com p19^{Arf}, mas também com IFN β é capaz de ativar a expressão de p53, como indica (Takaoka *et al.*, 2003). Além disso, como os genes de p21^{Waf1}, Mdm2 e Puma são transcricionalmente ativados por p53, é esperado notar que suas expressões aumentem após o aumento da transcrição de p53, como observado nesse experimento.

Figura 24: PCR quantitativa dos genes de p53 (A), p21^{Waf1} (B), MDM2 (C) e PUMA (D) evidenciando a superexpressão desses genes na presença da combinação de p19Arf + IFNβ em comparação com as outras condições. O RNA total extraído de células B16F10 para análise de *Microarray* foi usado para a reação de transcrição reversa e PCR quantitativa. A média da expressão dos genes de β-actina e Gapdh foi usada como referência. Os dados representam a média e desvio padrão de reações de PCR quantitativa de 5 experimentos independentes. A análise estatística foi feita com o teste Kruskal-Wallis, seguido por teste Mann-Whitney, *P<0,05 e **P<0,01.

Além dos principais genes envolvidos na via de p19^{Arf}/MDM2/p53, selecionamos para a validação alguns genes que estão indiretamente relacionados e que possuem grande importância nas redes de interação proteica que foram geradas com os genes modulados exclusivamente pela combinação de p19Arf + IFNβ (considerados *bridges* ou *brokers* nessas redes). Dentre esses genes estão FoxO1, Mdm4, Nr3c1, p73, Phlda3, RanBP9, Wdr46, Bcl2, cMyc, Mdh1, Nek6, Sin3A e Tfap4.

Como observado na **Figura 25**, os genes FoxO1, Mdm4, Nr3c1, p73, Phlda3, RanBP9 e Wdr46 foram validados em nossos experimentos, por possuírem a expressão intensamente modulada apenas pelo tratamento combinado de p19Arf + IFN β .

Continua

E

F

Figura 25: PCR quantitativa do gene de FoxO1 (A), Mdm4 (B), NR3C1 (C), p73 (D), PHLDA3 (E), RANBP9 (F) e WDR46 (G) evidenciando a superexpressão desses genes na presença da combinação de p19Arf + IFN β em comparação com as outras condições. O RNA total extraído de células B16F10 para análise de *Microarray* foi usado para a reação de transcrição reversa e PCR quantitativa. A média da expressão dos genes de β -actina e Gapdh foi usada como referência. Os dados representam a média e desvio padrão de reações de PCR quantitativa de 5 experimentos independentes. A análise estatística foi feita com o teste Kruskal-Wallis, seguido por teste Mann-Whitney, * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

No entanto, os genes de Bcl-2, cMyc, Mdh1, Nek6, Sin3A e Tfp4, que se mostraram, pelo resultado do *microarray*, estar diferencialmente expressos exclusivamente quando as células são tratadas com a combinação de p19Arf + IFN β , não foram validados pela PCR quantitativa. Apesar de alguns desses genes terem sua

expressão alterada pelo tratamento combinado, como é mostrado na **Figura 26**, o tratamento com os genes isolados também foi capaz de modular essa expressão, em alguns casos.

A

B

C

D

Continua

Figura 26: PCR quantitativa do gene de Bcl-2 (A), cMyc (B), Mdh1 (C), Nek6 (D), Sin3A (E) e Tfp4 (F) mostrando que não é apenas o tratamento de p19Arf + IFN β que modula a expressão desses genes. O RNA total extraído de células B16F10 para análise de *Microarray* foi usado para a reação de transcrição reversa e PCR quantitativa. A média da expressão dos genes de β -actina e Gapdh foi usada como referência. Os dados representam a média e desvio padrão de reações de PCR quantitativa de 5 experimentos independentes. A análise estatística foi feita com o teste Kruskal-Wallis, seguido por teste Mann-Whitney, * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

4.7 Análise da expressão das diferentes variantes de p73

Observamos em resultados anteriores que ocorre um grande aumento da expressão de p73 pelas células apenas quando tratadas pela combinação de p19Arf + IFN β . No entanto, não sabemos quais as variantes deste RNAm, e também proteína, se encontram aumentadas. Em camundongos são descritas 3 isoformas de RNAm: a TAp73alpha, que é a isoforma longa da proteína e é descrita como anti-tumoral; a isoforma DNp73alpha, considerada uma das formas dominante-negativas de p73 e que não possui os mesmos éxons da porção 5' da isoforma TAp73alpha, mas sim éxons diferentes; e a DNp73zeta, outra isoforma dominante-negativa que, além de não possuir alguns éxons da porção 5', não possui dois éxons da porção 3', quando comparada com a isoforma TAp73alpha (Grob *et al.*, 2001).

Para diferenciar as isoformas descritas, desenhamos iniciadores para detectar apenas a expressão da isoforma TAp73alpha ou das isoformas DNp73, não distinguindo entre elas. No entanto, obtivemos sucesso com a amplificação apenas das isoformas

DNp73, como mostrado na **Figura 27A**, e verificamos que essas isoformas são aumentadas apenas quando as células são tratadas com a combinação de p19Arf + IFN β . Para detectar a isoforma TAp73alpha, realizamos a extração proteica das células tratadas e verificamos, por western blot, que há um também aumento dessa isoforma após o tratamento combinado de p19Arf + IFN β (**Figura 27B**).

Figura 27: Expressão das diferentes variantes de p73 após tratamento com os vetores. Células B16F10 foram plaqueadas a 8×10^5 em placa de 100 mm e, no dia seguinte, transduzidas com MOI de 500 dos vetores AdRGD-PG-eGFP (GFP), AdRGD-PG-p19^{Arf} (p19Arf), AdRGD-PG-IFN β (IFN β) ou AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β (p19+IFN β), sendo que 36 horas após a transdução, as células foram lisadas para extração de RNA e proteína total. Em (**A**) observa-se a expressão relativa da isoforma DNp73 36 horas após a transdução com os vetores, verificada por qPCR de 5 experimentos independentes e em (**B**) observa-se a expressão total de TAp73 36 horas após a transdução com os vetores, verificada a partir de extrato proteico de células transduzidas com os vetores. A análise estatística foi feita com o teste Kruskal-Wallis, seguido de Mann Whitney test, *P<0,05 e **P<0,01.

4.8 Validação funcional dos genes superexpressos pelo tratamento de p19Arf + IFN β em ensaio de silenciamento da expressão gênica

Os genes que foram validados pela PCR quantitativa como sendo exclusivamente superexpressos pelo tratamento de p19Arf + IFN β foram escolhidos para a validação funcional, através de um ensaio de silenciamento da expressão desses genes com siRNA em combinação à transdução com os vetores adenovirais. Para isso, analisamos o perfil de ciclo celular de B16F10 transfectadas com os siRNA correspondentes aos genes de interesse e transduzidas com os vetores adenovirais. Esse ensaio indica se a superexpressão desses genes, devido ao tratamento com os vetores, é

imprescindível para que ocorra a morte das células. Se a expressão desses genes for bloqueada, não haverá a superexpressão deles como consequência da transdução com os vetores e, possivelmente, isso pode bloquear a morte das células B16F10. Esse ensaio foi realizado de diversas maneiras, a fim de obter sua padronização.

Em um primeiro momento, realizamos a transfecção de um siRNA-FITC em diferentes concentrações, utilizando o protocolo de transfecção com oligofectamina e observamos que as transfecções com 50 nM ou mais de siRNA-FITC, em placa de 6 poços contendo 2×10^5 B16F10, foram semelhantemente eficientes, atingindo quase 100 % das células e resultando em um maior nível de expressão de FITC por essas células, como mostra a **Figura 28**.

Figura 28: Porcentagem de células transfectadas com siRNA-FITC. Células B16F10 foram plaqueadas a 1×10^5 em placa de 6 poços e, no dia seguinte, transfectadas com siRNA-FITC em diferentes concentrações, seguindo protocolo de transfecção com oligofectamina. Em cada gráfico observa-se a porcentagem de células positivas para FITC. Em (A) observa-se a população de células analisadas para detecção de fluorescência em citômetro de fluxo (FACS Calibur, Becton Dickinson, San Jose, CA); em (B) essa mesma população de células analisada para a verificação da fluorescência; em (C) células transfectadas com 100 nM de siRNA-FITC; em (D) células transfectadas com 75 nM de siRNA-FITC; em (E) células transfectadas com 50 nM de siRNA-FITC; em (F) células transfectadas com 25 nM de siRNA-FITC; e em (G) células transfectadas com 10 nM de siRNA-FITC.

Após determinar a concentração de 50 nM de siRNA a ser utilizada nas transfecções, realizamos a transfecção de siRNA para os genes específicos, sendo que, após a transfecção, as células B16F10 foram transduzidas como de costume com os

vetores AdRGD-PG-eGFP ou AdRGP-PG-p19^{Arf} + Ad-RGD-PG-IFN β . Com o silenciamento dos genes de interesse, esperávamos observar uma diminuição da morte celular após o tratamento com p19Arf + IFN β , indicando que a expressão daquele certo gene é importante para a resposta da célula frente ao tratamento. Como visto na **Figura 29**, nenhum tratamento com siRNA resultou na redução de morte celular. Em paralelo, a expressão do gene alvo do siRNA foi determinada por PCR quantitativa (**Figura 30**), revelando vários níveis de eficiência do *knockdown* e ainda um resultado não antecipado, o aumento da expressão do gene na presença do siSCR, conforme detalhado a seguir.

Figura 29: Porcentagem de células B16F10 hipodiploides após silenciamento da expressão gênica e tratamento com p19Arf + IFN β . Células B16F10 foram plaqueadas a 1×10^5 em placa de 6 poços e, nos dois dias seguintes, transfectadas com 50 nM de siRNA *scramble* ou de FOXO1, NR3C1, p73, PHLDA3, WDR46, RANBP9 e SIN3A, seguindo protocolo de transfecção com oligofectamina, e transduzidas, duas horas após a última transfecção, com MOI de 500 dos vetores AdRGD-PG-eGFP (GFP), AdRGD-PG-p19^{Arf} (p19Arf), AdRGD-PG-IFN β (IFN β) ou AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β (p19Arf + IFN β). Nesse gráfico, observa-se a população de células hipodiploides coletadas 72 horas após a transdução de 3 experimentos independentes. A análise estatística foi feita com o teste de One-way ANOVA, seguido por Tukey's Multiple Comparison Test, *P<0,05 e **P<0,01.

O qPCR revelou 3 categorias de resultados (**Figura 30**): para os genes FoxO1 e NR3C1, houve o silenciamento adequado da expressão gênica quando comparamos o grupo tratado com p19Arf+IFN β *versus* grupo siRNA para o alvo + p19Arf+IFN β (teste-t não pareado, $p < 0,05$), mas mesmo assim, não houve inibição da morte celular (**Figura 29**). Além disso, o tratamento com siSCR + GFP induziu a expressão de FoxO1 e Nr3c1 (**Figura 30**). Na segunda categoria, observamos para o gene de p73, que o silenciamento não ocorreu de forma adequada, mas também não houve indução da expressão gênica no grupo do siSCR + GFP. Na terceira categoria, observamos para o restante dos genes (SIN3A, PHLDA3, RANBP9 e WDR46), que o silenciamento não ocorreu de forma adequada e que o tratamento com siSCR + GFP induziu a expressão gênica. Em todos os casos, observamos que a transfecção com siSCR + p19Arf+IFN β foi muito superior em induzir a expressão dos genes de interesse. Um resumo dos resultados obtidos com o silenciamento gênico é apresentado na **Tabela 5**.

Continua

Continuação

Figura 30: Expressão gênica de FoxO1, NR3C1, p73, SIN3A, PHLDA3, RANBP9 e WDR46 após silenciamento da expressão gênica e tratamento com p19Arf + IFNβ. Células B16F10 foram plaqueadas a 1×10^5 em placa de 6 poços e, nos dois dias seguintes, transfectadas com 50nM de siRNA *scramble* ou de FOXO1 (A), NR3C1 (B), p73 (C), SIN3A (D), PHLDA3 (E), RANBP9 (F) e WDR46 (G), seguindo protocolo de transfecção com oligofectamina, e transduzidas, duas horas após a última transfecção, com MOI de 500 dos vetores AdRGD-PG-eGFP (GFP) ou AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFNβ (p19Arf + IFNβ). Nesse gráfico, observa-se o nível de expressão relativo dos genes 36 horas após a transdução com os vetores de 3 experimentos independentes. A média da expressão de β-actina foi usada como referência. A análise estatística foi feita com o teste de Kruskal-Wallis, seguido de Mann Whitney test, *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001.

Gene	Análise da Expressão Gênica	Análise de Células Hipodiplóides
FoxO1	Transfecção com siSCR induz expressão gênica na presença de GFP e esse nível é aumentado na presença de p19Arf + IFNβ.	O silenciamento não foi capaz de inibir a morte celular induzida por p19Arf + IFNβ
NR3C1	Silenciamento com o siRNA para o alvo ocorreu de forma adequada.	
p73	siSCR não induz expressão gênica na presença de GFP e sim na presença de p19Arf + IFNβ. Silenciamento com o siRNA para o alvo não ocorreu de forma adequada.	
SIN3A	Transfecção com siSCR induz expressão gênica na presença de GFP e esse nível é aumentado na presença de p19Arf + IFNβ.	
PHLDA3	Silenciamento com o siRNA para o alvo não ocorreu de forma adequada.	
RANBP9		
WDR46		

Tabela 5: Descrição dos resultados obtidos com o experimento de validação funcional dos genes por silenciamento da expressão gênica.

5 DISCUSSÃO

A transferência gênica de p19Arf e IFN β às células B16F10 consiste em uma eficiente nova abordagem antitumoral. Isso foi confirmado por ensaios que demonstram que a combinação p19Arf + IFN β tem um impacto na diminuição da viabilidade e crescimento celular e na indução de morte envolvendo proteínas da via de apoptose, bem como da via de necroptose, e culminando na liberação de fatores imunogênicos, os quais podem ter um importante impacto na ativação do sistema imunológico do hospedeiro.

Existem muitos tipos de morte celular, mas historicamente, existem 3 tipos identificados que são mais estudados. São eles a apoptose (tipo I), a morte celular autofágica (tipo II) e a necrose (tipo III). A necrose ainda pode ser classificada como necrose programada, ou necroptose, se induzida por vias moleculares. As vias de apoptose e necroptose podem se comunicar intracelularmente.

A apoptose pode ser ativada pela via intrínseca/mitocondrial ou pela via extrínseca. Essas vias podem interagir e as moléculas de uma via podem ter influência sobre a outra (Igney e Krammer, 2002). A via extrínseca envolve a interação de ligantes com receptores transmembrânicos, sendo os mais conhecidos FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 e Apo2L/DR5 (Locksley *et al.*, 2001).

A sinalização por TNFR1 pode gerar a formação de 2 complexos celulares. O primeiro deles é constituído de TRADD (*TNFR1-associated death domain*), RIPK1, TRAF2 (*TNF-receptor-associated factor 2*), os inibidores de apoptose (cIAP1 or cIAP2) e o complexo LUBAC (*linear ubiquitin chain assembly complex*). Esse primeiro complexo causa ubiquitinação de RIPK1 e favorece uma sinalização pro-inflamatória, prevenindo a morte celular através do recrutamento de TAK1 (*TGF-activated kinase 1*) e TAB (*TAK1-binding protein*) e complexos de IKK (I κ B kinase), NEMO (*NF- κ B essential modulator*), culminando na ativação de MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) (Silke e Brink, 2010). A desestabilização do primeiro complexo leva à formação do complexo IIa, que é constituído por TRADD, FADD e caspase-8, o qual culmina na apoptose celular (Micheau e Tschopp, 2003). A caspase-8 inativa RIPK1 e RIPK3 através de clivagem proteolítica e inicia a cascata de ativação de caspases, levando à apoptose celular (Feng *et al.*, 2007). Alternativamente, na ausência de caspase-8, pode

ser formado um complexo I_{IIb}, que é constituído por RIPK1 e RIPK3, que sinaliza para necroptose.

Nos ensaios realizados, foi possível observar a atuação de caspase-3 na clivagem de PARP e a exposição de fosfatidilserina, ambos indicativos de apoptose. No entanto, não foi possível bloquear a apoptose com o inibidor de caspases Z-VAD-FMK. Além disso, observamos um aumento da expressão de RIPK3 apenas após as células serem tratadas com a combinação de p19Arf + IFN β . Receptores de morte, tais como TNFR1, Fas/CD95 e TRAIL-R, e receptores do tipo Toll-like, tais como TLR3 e TLR4, têm mostrado induzir necrose na presença de inibidores de caspase (Kroemer *et al.*, 2009). Isso pode explicar o motivo de haver ativação de caspase-3, como visto pela clivagem do DEVD, após o tratamento com p19Arf, mas perda dessa ativação quando as células são transduzidas com a combinação de p19Arf + IFN β . Possivelmente, a via clássica de ativação de caspases na indução da apoptose ocorre quando as células são transduzidas com p19Arf, mas essa via é desviada para atuar sobre outras proteínas, que não as caspases, quando IFN β é adicionado no contexto. Dessa forma, ainda são necessários mais ensaios para elucidar melhor a interação e sinalização dessas vias após tratamento com os vetores e, assim, definir quais proteínas estão ativadas e possuem um papel importante na indução da morte celular.

A autofagia promove a reciclagem de nutrientes celulares, dessa forma, permitindo que as células sobrevivam durante a privação de nutrientes. No entanto, pode causar a morte celular se intensamente induzida. A morte celular autofágica foi originalmente definida como um tipo de morte celular acompanhada por vacuolização massiva do citoplasma (Levine e Yuan, 2005), que sequestra componentes celulares para serem digeridos em autofagossomos (Kroemer *et al.*, 2009). Autofagossomos são vesículas de duplas membranas citoplasmáticas que, após engolfarem os componentes celulares, se fusionam com lisossomos e se tornam autolisossomos, onde os componentes são digeridos (Tsujimoto e Shimizu, 2005).

A proteína LC3 é requerida para a expansão da membrana do autofagossomo (Lamb *et al.*, 2013) e, portanto, amplamente utilizada para a detecção da ocorrência de autofagia. LC3 foi originalmente identificada como uma proteína co-purificada com as proteínas associadas a microtúbulos 1A e 1B de cérebros de ratos (Mann e Hammarback, 1994). Existem duas formas de LC3 nas células, sendo a LC3-I citosólica e processada na forma LC3-II, que é presente na membrana dos autofagossomos e

autolisossomos (Kabeya *et al.*, 2000). Durante um curto período, a quantidade de LC3-I pode diminuir e de LC3-II aumentar. Entretanto, se as células são estimuladas por um período maior, ambas LC3-I e LC3-II desaparecem, pois a LC3-II se encontra tanto na membrana interna quanto externa de autofagossomos e é degradada dentro dos autolisossomos, enquanto que a porção presente na membrana externa é desconjugada por Atg4 e retorna ao citosol (Mizushima e Yoshimori, 2007). Como forma de inibir a degradação de LC3, tratamos as células com cloroquina (30 μ M por 90 minutos) que se concentra em vesículas ácidas, tais como lisossomos, e aumenta o pH delas, inibindo a função das enzimas lisossomais e prevenindo a degradação de LC3-II (De Duve *et al.*, 1974). Dessa forma, impedimos que a proteína LC3-II expressa pelas células tratadas com a combinação de p19Arf + IFN β fossem degradada. Entretanto, não foi possível observar aumento de expressão de LC3-II após o tratamento, indicando provavelmente que a autofagia não está envolvida no processo de morte causado por p19Arf + IFN β .

Nesse trabalho, mostramos que o efeito parácrino de IFN β é extremamente importante na indução de morte *in vitro* e *in vivo* das células B16F10, especialmente quando previamente transduzidas com p19Arf. Isso fortalece a terapia aqui proposta, uma vez que os efeitos são estendidos às células que não foram passíveis de receber o tratamento com os vetores e aumentados no caso de as células terem sido transduzidas com p19Arf. No ensaio *in vivo*, acreditamos que, pelo fato da ação de p19Arf ser localizada apenas nas células que foram transduzidas, essas células acabam morrendo e a ação do transgene é limitada apenas enquanto essas células estiverem vivas. Já o efeito do IFN β é mais abrangente por ele ser uma citocina secretada e, mesmo que as células transduzidas morram, a citocina já liberada no microambiente tumoral atinge as células ao redor que podem não ter sido transduzidas. Além disso, os efeitos do IFN β podem incluir recrutamento de células do sistema imune que auxiliam na erradicação do tumor.

A combinação de p19Arf + IFN β é mais eficiente do que o uso dos genes isolados em todos os aspectos analisados. O intuito desse projeto foi evidenciar o benefício trazido pela combinação de p19Arf + IFN β no tratamento de células B16F10 e determinar quais os mecanismos responsáveis por isso. O efeito superior da combinação em relação aos tratamentos isolados é claramente observado na expressão gênica das células tratadas. Os transgenes combinados não apenas têm um efeito aditivo sobre as células B16F10, como também um efeito sinérgico. Isso é evidenciado uma vez que

existem 1054 genes que são modulados apenas quando as células são tratadas com p19Arf + IFN β , sendo que isso não ocorre em nenhum outro caso.

Embora nós não tenhamos identificado o fator determinante para a morte causada por p19Arf + IFN β nas células B16F10, nós mostramos a importância de muitos genes e vias envolvidos nesse processo.

Dentre os genes escolhidos para serem estudados nesse projeto, estão os genes clássicos da via de p19^{Arf}/MDM2/p53, tais como o próprio trp53, p21^{Waf1}, Mdm2 e Puma, além de outros genes não tão óbvios de serem modulados pela combinação de p19Arf + IFN β .

A proteína p53 pode atuar na inibição do crescimento celular tanto através da ativação da parada do ciclo celular, como da apoptose (Bates *et al.*, 1999). A proteína p21^{Waf1} foi originalmente identificada a partir de uma varredura de alvos transcricionais de p53 e foi mostrada como uma mediadora da parada do ciclo celular em G1 induzida por p53 (El-Deiry *et al.*, 1993). Já PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) medeia a apoptose induzida por p53. É uma proteína que contém um domínio BH3 e está localizada na mitocôndria, onde interage com Bcl-2 e atua na indução da liberação do citocromo c, dessa forma ativando as caspases 9 e 3 (Nakano e Vousden, 2001). Por fim, MDM2 foi originalmente identificada em cromossomos *double-minute* de fibroblastos 3T3 murinos espontaneamente transformados e, posteriormente, foi encontrada associada à p53, sendo também transcricionalmente induzida por p53 (Momand *et al.*, 1992).

A fim de ser identificar novas vias envolvidas com o tratamento, selecionamos para a validação alguns genes que são pouco conhecidos de estarem relacionadas com a via de p19^{Arf}/MDM2/p53. Dentre esses genes, muitos estão também envolvidos com a via de AKT1. As vias de p53 e AKT1 regulam a viabilidade e morte celular controlando oncoproteínas e proteínas supressoras de tumor, as quais permitem um balanço entre sinais de crescimento celular e supressores de crescimento (Cully *et al.*, 2006).

A ativação de AKT1 se dá por sinais mitóticos extracelulares atuando através de receptores acoplados à proteína G ou do tipo tirosina kinase (Bellacosa *et al.*, 2005). Esses receptores ativam fosfatidil-3-kinase (PI 3-kinase) que por sua vez fosforila o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato presente na membrana para gerar fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃). Esse segundo mensageiro interage com o domínio de homologia a plekstrina de Akt, recrutando a kinase à membrana plasmática e expondo os resíduos

Thr308 e Ser473 para serem fosforilados por proteínas kinases associadas à membrana (Testa e Bellacosa, 1997). A proteína kinase 1 dependente de fosfoinositol fosforila AKT na Thr308 e mTOR fosforila Akt na Ser473 (Sarbasov et al., 2005; Bhaskar and Hay, 2007). A via de ativação de Akt pode ser antagonizada por uma fosfatase que remove o fosfato-3' do fosfatidylinositol 3,4-bifosfato e PIP₃ (Maehama e Dixon, 1999).

Existem 3 isoformas de mamíferos da serina/threonina kinase, Akt1, Akt2 e Akt3. Cada isoforma possui 3 domínios distintos e conservados: um domínio NH₂-terminal de homologia a plekstrina, um domínio catalítico kinase e uma cauda curta COOH-terminal. A proteína Akt fosforila uma quantidade de proteínas envolvidas na apoptose, regulação do ciclo celular, síntese proteica e metabolismo de glicogênio (Testa e Bellacosa, 2001). Ela exerce efeitos antiapoptóticos através da fosforilação de substratos que regulam diretamente a maquinaria apoptótica, tais como Bad e pró-caspase 9 (Cardone *et al.*, 1998) e fosforila proteínas que indiretamente inibem a apoptose, tais como fatores de transcrição Forkhead (Kops e Burgering, 1999). Akt estimula a progressão do ciclo celular induzindo a expressão e fosforilação de inibidores de kinases dependentes de ciclinas, p27 e p21^{Waf1}, causando sua retenção no citoplasma (Collado *et al.*, 2000), além de induzir acúmulo de ciclina D1 via inativação da enzima glicogênio sintase kinase 3 (Diehl *et al.*, 1998). Além disso, Akt também tem a capacidade de fosforilar e ativar IKK α , um componente kinase que regula a ativação de NF- κ B (Dan *et al.*, 2008). IKK α ativada fosforila I κ B, marcando-a para degradação via proteassomo. Como resultado, NF- κ B é ativada e transloca para o núcleo, onde ativa a transcrição de genes de sobrevivência.

Já a regulação mútua entre Akt e p53 envolve substratos de Akt e genes alvo de p53 como, por exemplo, Pten. Pten codifica uma fosfatase que desfosforila PIP₃. Por outro lado Akt fosforila Mdm2 (Brooks e Gu, 2006) que regula negativamente p53. Além disso, outro gene alvo de p53, Phlda3, codifica uma proteína do tipo *PH domain-only* que suprime a atividade de Akt, pois inibe a ligação de Akt à membrana lipídica, o que contribui para a apoptose induzida por Phlda3. Mais especificamente, Phlda3 se liga a cada PI(3)P, PI(4)P ou PI(5)P e a qualquer combinação de PIP₂s, dessa forma competindo com Akt pela ligação a ambos PI(3,4)P₂ e PI(3, 4, 5)P₃, os dois únicos lipídeos aos quais Akt se liga (Kawase *et al.*, 2009) e reprimindo a fosforilação de Akt em Thr308 e Ser473. A ligação de Phlda3 a PI(3,4)P₂ e PI(3, 4, 5)P₃ ocorre com maior afinidade do que a ligação de Akt a eles. A proteína Phlda3 foi originalmente

identificada como uma proteína induzida por p53 envolvida na resposta a stress mediado por dano ao DNA (Kerley-Hamilton *et al.*, 2005). Seu promotor contém dois motivos de ligação a p53 e sua expressão é regulada diretamente por p53. Phlda3 também participa na resposta de apoptose mediada por p53.

Akt também possui associação com GR α , um receptor nuclear de glucocorticoides ativado por ligante e fator de transcrição, codificado pelo gene Nr3c1 (Schlossmacher *et al.*, 2011). Na ausência de ligantes, GR α permanece no citoplasma em forma de um heterocomplexo coordenado por associação com chaperonas, tais como heat shock proteins 40 (hsp40), hsp70 e hsp90 e cochaperonas como hsp70-*interacting protein* (hip) e hsp70/hsp90-*organizing protein* (hop). Essa associação mantém o receptor apto a receber o ligante, na conformação apropriada para que o ligante se associe à porção hidrofóbica C-terminal do receptor. Quando glucocorticoides se difundem pela membrana plasmática, eles se ligam ao GR induzindo uma mudança conformacional no receptor, que, a partir disso, forma um homodímero e se transloca para o núcleo. Como fator de transcrição, uma vez no núcleo, GR pode se ligar aos elementos responsivos a glucocorticoides e ativar ou inibir a expressão de genes (Biddie *et al.*, 2012).

Os glucocorticoides têm um papel importante no tratamento de tumores linfoides devido à sua capacidade de induzir apoptose em células linfoides progenitoras (Inaba e Pui, 2010). Akt se liga ao receptor de glucocorticoide Nr3c1, fosforilando essa proteína na posição Ser134, inibindo sua translocação nuclear após tratamento com glucocorticoides e impedindo uma resposta efetora chave de morte celular mediada por Nr3c1, incluindo autoregulação do receptor de glucocorticoide (Geng *et al.*, 2008) e indução de Bcl2L11, um fator pró-apoptótico essencial para a morte celular induzida por glucocorticoides (Wang *et al.*, 2003).

Em um estudo realizado por (Piovan *et al.*, 2013), o tratamento de linfoblastos (acute lymphoblastic leukemia - T-ALL) com MK2206, um inibidor de Akt, aumentou a translocação de Nr3c1 para o núcleo após tratamento com glucocorticoides. A análise da fosforilação de Akt mostrou que houve supressão da sinalização de Akt em camundongos tratados com MK2206 ou MK2206 mais dexametasona (glucocorticoide sintético) *in vivo*. Nesse mesmo trabalho, a clivagem de Parp-1 mostrou um aumento da resposta a glucocorticoides e apoptose em infiltrado leucêmico de camundongos tratados com MK2206 mais dexametasona. Além disso, quando os autores realizaram

a transferência gênica por retrovírus do receptor de glucocorticoide em células T-ALL, houve um aumento da resposta induzida por Notch1 após tratamento com glucocorticoides. Os autores também testaram a expressão em células T-ALL da proteína de Nr3c1 mutante na posição S134A, o que a torna resistente a Akt, e observaram que isso tornou as células sensíveis aos efeitos anti-leucêmicos do tratamento com glucocorticoides (Piovan *et al.*, 2013).

Sabe-se também que GR pode interagir fisicamente com membros da família STAT (*signal transducers and activator of transcription*) para aumentar a transcrição de certos genes alvo. Ao menos 7 resíduos de serina (Ser113, Ser134, Ser141, Ser203, Ser211, Ser226 e Ser404) podem ser fosforilados e essas modificações pós-traducionais de GR modulam sua atividade de fator de transcrição. Além disso, existem dois outros sítios de fosforilação na Ser45 e Ser267. O receptor apresenta um nível basal de fosforilação e se torna hiperfosforilado após ligação aos glucocorticoides. A fosforilação na Ser134 pode ser independente de hormônios e ocorre sob condições de stress, como falta de glicose, stress oxidativo, irradiação UV e choque osmótico (Ramamoorthy e Cidlowski, 2013).

Glucocorticoides tem uma atividade anti-mieloma e têm se mostrado atuar sinergisticamente com a maioria dos outros agentes anti-mielomas. No entanto, apenas aproximadamente metade dos pacientes responde à dexametasona. Os efeitos favoráveis à sobrevida associados a altos níveis de Nr3c1 são consistentes com um bom prognóstico. Dexametasona e thalidomida são importantes componentes da terapia para mieloma. (Heuck *et al.*, 2012) observaram que a baixa expressão de Nr3c1 em mielomas aumenta significativamente o risco de morte do paciente comparado com pessoas que apresentam níveis médios e altos do receptor e que, essas pessoas que apresentam baixa expressão de Nr3c1, foram mais beneficiadas com o tratamento com thalidomida. Analisando o perfil de expressão gênica após a exposição a vários agentes *in vivo*, os autores descobriram que Nr3c1 teve a expressão aumentada por ambos dexametasona e thalidomida, o que compensa os efeitos negativos da baixa expressão de Nr3c1 e promove apoptose das células de mieloma.

A via de PI3K/Akt regula proliferação celular e sobrevivência em parte por causar a fosforilação de FoxO (*forkhead transcription factor*), o que promove sua interação com a proteína 14-3-3, resultando na exclusão nuclear de FoxO e eventual degradação na via de ubiquitina/proteassomo (Matsuzaki *et al.*, 2003). FoxOs são

inativados na maioria dos cânceres humanos, devido à superativação da via de PI3K/Akt, a qual ocorre devido a mutações em Ras, Pten ou PI3K (Dansen e Burgering, 2008). A fosforilação por Akt inativa FoxO resultando no seu acúmulo no citoplasma e promove sobrevivência celular, uma vez que FoxO regula a proteína pró-apoptótica Trail.

Os fatores de transcrição FoxO regulam vias de diferenciação celular, crescimento, sobrevivência, ciclo celular, metabolismo, stress e supressão tumoral, através da ativação ou repressão da transcrição de genes. FoxO possuem um domínio FOX de ligação ao DNA no núcleo, e sua translocação nucleocitoplasmática é regulada por suas sequências específicas de sinalização para importação ou exportação nuclear. A localização subcelular e função transcricional de FoxO são reguladas principalmente através de modificações pós-traducionais, tais como fosforilação, acetilação e ubiquitinação (Fu e Tindall, 2008), sendo que no núcleo, FoxO suspende a progressão do ciclo celular (Medema et al., 2000) e promove apoptose (Urbich *et al.*, 2005).

Existem muitas conexões entre as vias de FoxO e p53 e essas proteínas p53 coordenam de forma similar a sinalização de supressão tumoral (Fu e Tindall, 2008). FoxO medeia parada do ciclo celular, morte celular e stress celular oxidativo para manter estabilidade metabólica através da ativação transcricional de genes envolvidos com essas vias. A proteína supressora tumoral p53 também possui funções similares para promover reparo do DNA e manter a estabilidade genômica (Dansen e Burgering, 2008). A parada do ciclo celular devido a FoxO e p53 ocorre através da indução de seus genes alvo, tais como p16, p21^{WAF1/CIP1} e p27^{KIP1} (Levine *et al.*, 2004) e essas proteínas atuam também em genes alvos comuns, como GADD45, WIP1 e PA26.

A indução de apoptose por FoxO e p53 também é redundante, uma vez que ambos promovem a superexpressão de proteínas BH3-only pró-apoptóticas. FoxOs são conhecidos por superexpressar Bim e Puma, enquanto que Puma também é superexpresso por p53. FoxO pode induzir a morte celular através da via intrínseca de apoptose mediada pela mitocôndria, mas também pode regular diretamente a via extrínseca de apoptose através da superexpressão de fatores pró-apoptóticos, como FasL e TRAIL. Dessa forma, FoxO regula a morte celular através da modulação de proteínas BH3-only (Bim e BNIP3) e proteínas ligantes de receptores de morte (FasL e TRAIL), atuando assim em vias autócrinas e parácrinas (Zhang *et al.*, 2011).

Em um estudo realizado por (Amin *et al.*, 2007), FoxO1a e seu alvo pró-apoptótico Bim têm o nível de expressão aumentado após tratamento com Concanavalina A em células 041, uma lectina que promove apoptose em células que não possuem p53. No entanto, esse efeito não ocorre em células que expressam DNp73 (*dominant negative* p73), ou seja, com p73 inativo. Após tratamento com Concanavalina A, os autores observaram que houve apenas uma pequena ativação de Akt (baixos níveis de fosforilação) em células 041. No entanto, a fosforilação de Akt foi maior em células expressando DNp73. Isso sugere que a ativação de p73 por Concanavalina A inibe a fosforilação de Akt, pois FoxO é substrato direto de Akt (Amin *et al.*, 2007).

A proteína p73 é mantida em níveis baixos em condições normais, entretanto p73 é significativamente induzida no nível proteico em resposta a stress genotóxico, sendo fosforilada no resíduo Tyr99 ou Ser289 (Ren *et al.*, 2002) e, dessa forma, estabilizada. p73 é regulada em parte pelo processo de degradação proteica através do sistema de ubiquitina-proteassomo, sendo que a sua porção C-terminal pode ter um papel regulatório na degradação de p73 dependente de proteassomo (Lee e La Thangue, 1999). Essa porção também é responsável por interagir fisicamente com RanBP9, a qual não tem a capacidade de interagir com p53.

Ran-binding protein 9 (RanBP9 ou RanBPM) é uma fosfoproteína nucleocitoplasmática cuja função permanece em parte desconhecida. Muitos relatos sugerem que RanBP9 contribui para a regulação de várias funções envolvidas com a sinalização celular, incluindo adesão celular e migração, regulação de microtúbulos e regulação da transcrição gênica (Atabakhsh *et al.*, 2009). Essa proteína é modulada por estímulos de stress como choque osmótico, radiação UV (Denti *et al.*, 2004) ou radiação ionizante em um sítio consenso reconhecido por kinases ativadas por dano no DNA, como ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), ATR (*ataxia telangiectasia mutated related*) e DNA-PK (proteína kinase dependente de DNA) (Matsuoka *et al.*, 2007). RanBP9 apresenta 3 motivos conservados: um domínio SPRY, responsável por mediar interações proteicas; um motivo LisH [*Lissencephaly type 1 (Lis1) homologous*] responsável por mediar a formação de dímeros e tetrâmeros proteicos; e um motivo CTLH (C-terminal a LisH) cuja função ainda é desconhecida (Rhodes *et al.*, 2005).

(Kramer *et al.*, 2005) observou que quando RanBP9 e p73 α foram expressos simultaneamente, uma fração de RanBP9 foi translocada para o núcleo e co-localizada com p73 α nuclear, o que indica que a interação dessas duas proteínas se dá no núcleo e

isso pode afetar a estabilidade de p73 α . Isso foi observado de fato, uma vez que os níveis da proteína p73 α foram aumentados na presença de RanBP9 enquanto que os níveis do RNAm de p73 α não foram afetados. Além disso, a meia-vida de p73, que é normalmente menos de 4h, foi aumentada na presença de RanBP9, mostrando que a estabilização de p73 α pode ser decorrente da diminuição na sua taxa de degradação, o que é resultado da diminuição na ubiquitinação de p73 α . A coexpressão de p73 α com RanBP9 também aumentou o número de células apoptóticas, o que indica que a estabilização de p73 por RanBP9 é crítica para sua atividade transcricional e apoptose (Kramer *et al.*, 2005). Sabe-se também que, enquanto MDM2 provoca a ubiquitinação e consequente degradação de p53, os níveis de p73 são aumentados quando MDM2 está presente, e isso é decorrente da interação física entre essas proteínas e consequente retardo da degradação de p73. O aumento dos níveis de p73, por sua vez, ativa a transcrição de MDM2 em um feedback positivo. Além disso, MDM4, assim como MDM2, pode se ligar a p73 e estabilizá-lo (Ongkeko *et al.*, 1999), porém existem relatos que ambas as proteínas inibem a atividade transcricional de p73. MDM4 se liga também a p53 e inibe sua atividade transcricional, no entanto não é capaz de causar sua degradação. MDM4 também pode se ligar a MDM2 através do domínio RING C-terminal de ambas as proteínas e estabilizá-lo (Wang *et al.*, 2001). Além disso, a expressão de MDM2 ou MDM4 com p73 induzem uma mudança na localização desta proteína. MDM2 transloca p73 do núcleo para regiões paranucleares, enquanto MDM4 a transloca para o citoplasma. As localizações de p53 e p63 não são afetadas por MDM4 (Wang *et al.*, 2001).

Existem relatos de RanBP9 estar envolvida com a apoptose. Essa proteína interage com a quinase dependente de ciclina-11, isoforma p46, uma proteína envolvida na cascata de apoptose (Mikolajczyk *et al.*, 2003) e com o domínio de morte do receptor de neurotrofina p75, um fator membro da família de receptores de TNF (*tumor necrosis factor*) que está envolvido com a morte celular programada em neurônios (Bai *et al.*, 2003). Além disso, RanBP9 se associa a HipK2 (*homeodomain interacting protein kinase 2*) e a p73 a fim de modular vias de apoptose induzidas por dano no DNA (Kramer *et al.*, 2005).

Atabakhsh *et al.* (Atabakhsh *et al.*, 2009) observaram que a transfecção de RanBP9 em células HeLa causou morte celular entre 24 e 48 horas após a transfecção e que essa morte era devido a indução de caspase-3 e caspase-2. Em seu trabalho, os

autores desenvolveram um mutante de RanBP9 com uma do domínio SPRY e verificaram que essa proteína perdia a capacidade de induzir apoptose, embora seu nível de expressão não tivesse sido afetado. Sabe-se que o domínio SPRY da proteína Pyrin exibe um efeito inibitório na ativação de caspase-1 e subsequente processamento da pro-interleucina-1 β (Papin *et al.*, 2007), o que sugere a possibilidade de o domínio SPRY de RanBP9 ter outras funções e regular negativamente caspases ainda não definidas.

Além disso, o silenciamento de RanBP9 utilizando siRNA resultou em uma diminuição da ativação de caspase-3 após irradiação ionizante e da ativação de caspase-2, uma caspase induzida por dano ao DNA e stress. A atuação de RanBP9 na apoptose não é decorrente de aumento dos níveis de proteína após stress celular, mas sim da sua localização subcelular. Após tratamento com irradiação ionizante, houve uma realocação de RanBP9 do núcleo para o citoplasma de células HeLa, HCT116 e HEK293, o que causou uma diminuição dos níveis de Bax associado à mitocôndria e aumento dos níveis de Bcl-2 (Atabakhsh *et al.*, 2009).

Outra proteína regulada pela combinação de p19Arf e IFN β é a Wdr46 que, diferente das outras proteínas validadas em nosso trabalho, não possui relação com p53 e Akt1. Em um estudo com pacientes que continham melanoma metastático, uma paciente que teve seu tumor excisado e que apresentou recidiva após 4 meses, foi submetida a um protocolo clínico envolvendo adenovírus codificando MART-1 (*melanoma Ag recognized by T cells 1*) e apresentou remissão completa do tumor e continuou livre de doença até no mínimo 5 anos após o tratamento. Os linfócitos circulantes foram obtidos após a primeira injeção de adenovírus e analisados, identificando que essas células eram reativas ao antígeno tumoral Wdr46, descrito em bases de dados como presente no melanoma, retinoblastoma, choriocarcinoma, câncer de próstata, câncer de fígado, medula óssea, e células B tonsilares (Rosenberg *et al.*, 2002). Existem vários aspectos para a detecção de Wdr46 como um antígeno tumoral nessa paciente. Essa proteína possui função desconhecida e contém 610 aminoácidos codificantes de 15 éxons dentro de uma região do cromossomo 6 rica em genes considerada em representar uma extensa porção do MHC de classe II (Herberg *et al.*, 1998). A função de Wdr46 ainda é desconhecida, embora essa proteína possua muitos sinais de localização nucleares situados próximo à porção amino e carboxiterminal da proteína, sugerindo sua localização nuclear (Walter e Günther, 2000).

A expressão de Wdr46 foi identificada virtualmente em todos os tecidos normais. Análise por PCR quantitativa revelou que os níveis de expressão de Wdr46 em tecidos normais, incluindo melanócitos, bem como em outros tipos de tumores, foram baixos em relação aos níveis encontrados em melanomas. A correlação entre o nível de expressão do mRNA de Wdr46 e o reconhecimento de tumores por células T reativas à Wdr46 sugere fortemente que um nível de expressão de Wdr46 é necessário para mediar o reconhecimento tumoral (Rosenberg et al., 2002).

A indução dos genes FoxO1, Nr3c1, p73, Phlda3, RanBP9, Wdr46 e Sin3A nas células B16F10 após tratamento com a combinação de p19Arf + IFN β foi confirmada pela validação de sua expressão gênica por PCR quantitativa. Apesar de a validação funcional não ter sido possível, acreditamos que os genes escolhidos possuem um importante papel na indução de morte de células B16F10 por estarem relacionados com muitas vias proteicas, como indicado pela análise de genes *brokers*. Mesmo que nós não tenhamos verificado que a morte causada por p19Arf + IFN β é dependente da expressão dos genes aqui estudados, é notável o envolvimento desses genes na indução da morte.

6 CONCLUSÃO

A transferência gênica combinada de p19Arf e IFN β para célula B16F10 culmina na inibição do crescimento e viabilidade celular e indução da morte das células B16F10 de uma forma mais eficiente que os transgenes isolados.

O tratamento das células B16F10 com p19Arf induz a via de apoptose e o tratamento com a combinação de p19Arf + IFN β induz tanto a via de apoptose quanto de necroptose. Dessa forma, a clivagem do DEVD, como indicativo de ativação de caspase-3, ocorre após o tratamento com p19Arf e é perdida quando IFN β é acrescentado. Além disso, concluímos que a morte não é dependente de caspases, uma vez que o tratamento das células com um inibidor geral de caspases previamente à transdução com os vetores adenovirais não inibe a morte celular.

Células B16F10 tratadas com a combinação de p19Arf + IFN β apresentam a liberação/exposição dos 3 fatores indicativos de morte imunogênica, o que não é possível com os transgenes isolados.

Em ensaios *in vitro* e *in vivo* observamos que o IFN β é secretado e atua de forma parácrina sobre células vizinhas. Em ensaios *in vivo*, apenas a presença de IFN β já é suficiente para causar inibição do crescimento tumoral.

Como forma de elucidar os aspectos envolvidos na indução de morte, foi realizado um ensaio de *microarray* para determinar as vias gênicas ativadas nesse contexto. A partir desses dados, foi possível observar que ocorre um efeito sinérgico quando a transferência dos transgenes p19Arf + IFN β é combinada em células B16F10. Genes que não são modulados pelos tratamentos com os vetores isolados, passam a ter sua expressão alterada quando p19Arf + IFN β são combinados como tratamento das células B16F10, tais como FoxO1, Nr3c1, p73, Phlda3, RanBP9, Wdr46 e Sin3A.

7 BIBLIOGRAFIA

ALIZADEH, H. et al. Reduction of liver metastasis of intraocular melanoma by interferon-beta gene transfer. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 44, n. 7, p. 3042-51, Jul 2003. ISSN 0146-0404. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12824250> >.

AMIN, A. R. et al. A novel role for p73 in the regulation of Akt-Foxo1a-Bim signaling and apoptosis induced by the plant lectin, Concanavalin A. **Cancer Res**, v. 67, n. 12, p. 5617-21, Jun 2007. ISSN 0008-5472. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17575126> >.

ANDTBACKA, R. H. et al. Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. **J Clin Oncol**, v. 33, n. 25, p. 2780-8, Sep 2015. ISSN 1527-7755. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26014293> >.

ATABAKHSH, E. et al. RanBPM has proapoptotic activities that regulate cell death pathways in response to DNA damage. **Mol Cancer Res**, v. 7, n. 12, p. 1962-72, Dec 2009. ISSN 1557-3125. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19996306> >.

BAJGELMAN, M. C.; STRAUSS, B. E. Development of an adenoviral vector with robust expression driven by p53. **Virology**, v. 371, n. 1, p. 8-13, Feb 5 2008. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18076963 >.

BAKKENIST, C. J.; KASTAN, M. B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. **Nature**, v. 421, n. 6922, p. 499-506, Jan 2003. ISSN 0028-0836. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12556884> >.

BATES, S.; HICKMAN, E. S.; VOUSDEN, K. H. Reversal of p53-induced cell-cycle arrest. **Mol Carcinog**, v. 24, n. 1, p. 7-14, Jan 1999. ISSN 0899-1987. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10029405> >.

BELLACOSA, A. et al. Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. **Adv Cancer Res**, v. 94, p. 29-86, 2005. ISSN 0065-230X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16095999> >.

BENJAMIN, C. L.; ANANTHASWAMY, H. N. p53 and the pathogenesis of skin cancer. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 224, n. 3, p. 241-8, Nov 2007. ISSN 0041-008X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17270229> >.

BHATIA, S.; TYKODI, S. S.; THOMPSON, J. A. Treatment of metastatic melanoma: an overview. **Oncology (Williston Park)**, v. 23, n. 6, p. 488-96, May 2009. ISSN 0890-9091. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19544689> >.

BIDDIE, S. C.; CONWAY-CAMPBELL, B. L.; LIGHTMAN, S. L. Dynamic regulation of glucocorticoid signalling in health and disease. **Rheumatology (Oxford)**, v. 51, n. 3, p. 403-12, Mar 2012. ISSN 1462-0332. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21891790> >.

BORDEN, E. C. et al. Gene regulatory and clinical effects of interferon β in patients with metastatic melanoma: a phase II trial. **J Interferon Cytokine Res**, v. 31, n. 5, p. 433-40, May 2011. ISSN 1557-7465. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21235385> >.

BREM, H. et al. The combination of antiangiogenic agents to inhibit primary tumor growth and metastasis. **J Pediatr Surg**, v. 28, n. 10, p. 1253-7, Oct 1993. ISSN 0022-3468. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7505321> >.

BROOKS, C. L.; GU, W. p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. **Mol Cell**, v. 21, n. 3, p. 307-15, Feb 2006. ISSN 1097-2765. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16455486> >.

BURNETTE, B. C. et al. The efficacy of radiotherapy relies upon induction of type i interferon-dependent innate and adaptive immunity. **Cancer Res**, v. 71, n. 7, p. 2488-96, Apr 2011. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21300764> >.

CAI, J. J.; BORENSTEIN, E.; PETROV, D. A. Broker genes in human disease. **Genome Biol Evol**, v. 2, p. 815-25, 2010. ISSN 1759-6653. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20937604> >.

CAO, G. et al. Adenovirus-mediated interferon-beta gene therapy suppresses growth and metastasis of human prostate cancer in nude mice. **Cancer Gene Ther**, v. 8, n. 7, p. 497-505, Jul 2001. ISSN 0929-1903. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11498771> >.

CARDONE, M. H. et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. **Science**, v. 282, n. 5392, p. 1318-21, Nov 1998. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9812896> >.

CASARES, N. et al. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. **J Exp Med**, v. 202, n. 12, p. 1691-701, Dec 2005. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16365148> >.

CHAWLA-SARKAR, M. et al. IFN-beta pretreatment sensitizes human melanoma cells to TRAIL/Apo2 ligand-induced apoptosis. **J Immunol**, v. 169, n. 2, p. 847-55, Jul 2002. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12097388> >.

_____. Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. **Apoptosis**, v. 8, n. 3, p. 237-49, Jun 2003. ISSN 1360-8185. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12766484> >.

CHÈNE, P. Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 2, p. 102-9, Feb 2003. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12563309> >.

COLLADO, M. et al. Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27Kip1. **J Biol Chem**, v. 275, n. 29, p. 21960-8, Jul 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10791951> >.

CUDDIHY, A. R.; BRISTOW, R. G. The p53 protein family and radiation sensitivity: Yes or no? **Cancer Metastasis Rev**, v. 23, n. 3-4, p. 237-57, 2004 Aug-Dec 2004. ISSN 0167-7659. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15197326> >.

CULLY, M. et al. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 3, p. 184-92, Mar 2006. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16453012> >.

DAN, H. C. et al. Akt-dependent regulation of NF- κ B is controlled by mTOR and Raptor in association with IKK. **Genes Dev**, v. 22, n. 11, p. 1490-500, Jun 2008. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18519641> >.

DANSEN, T. B.; BURGERING, B. M. Unravelling the tumor-suppressive functions of FOXO proteins. **Trends Cell Biol**, v. 18, n. 9, p. 421-9, Sep 2008. ISSN 1879-3088. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18715783> >.

DE DUVE, C. et al. Commentary. Lysosomotropic agents. **Biochem Pharmacol**, v. 23, n. 18, p. 2495-531, Sep 1974. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4606365> >.

DENTI, S. et al. RanBPM is a phosphoprotein that associates with the plasma membrane and interacts with the integrin LFA-1. **J Biol Chem**, v. 279, n. 13, p. 13027-34, Mar 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14722085> >.

DIEHL, J. A. et al. Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. **Genes Dev**, v. 12, n. 22, p. 3499-511, Nov 1998. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9832503> >.

DROBITS, B. et al. Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells. **J Clin Invest**, v. 122, n. 2, p. 575-85, Feb 2012. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22251703> >.

DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The three Es of cancer immunoediting. **Annu Rev Immunol**, v. 22, p. 329-60, 2004. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15032581> >.

DURBIN, R. K.; KOTENKO, S. V.; DURBIN, J. E. Interferon induction and function at the mucosal surface. **Immunol Rev**, v. 255, n. 1, p. 25-39, Sep 2013. ISSN 1600-065X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23947345> >.

EINHORN, S.; GRANDER, D. Why do so many cancer patients fail to respond to interferon therapy? **J Interferon Cytokine Res**, v. 16, n. 4, p. 275-81, Apr 1996. ISSN 1079-9907. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9162520> >.

EL-DEIRY, W. S. Role of oncogenes in resistance and killing by cancer therapeutic agents. **Curr Opin Oncol**, v. 9, n. 1, p. 79-87, Jan 1997. ISSN 1040-8746. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9090498> >.

_____. Regulation of p53 downstream genes. **Semin Cancer Biol**, v. 8, n. 5, p. 345-57, 1998. ISSN 1044-579X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10101800> >.

EL-DEIRY, W. S. et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. **Cell**, v. 75, n. 4, p. 817-25, Nov 1993. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8242752> >.

ESTELLER, M. et al. Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status. **Cancer Res**, v. 60, n. 1, p. 129-33, Jan 2000. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10646864> >.

EYMIN, B. et al. Human ARF binds E2F1 and inhibits its transcriptional activity. **Oncogene**, v. 20, n. 9, p. 1033-41, Mar 2001. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11314038> >.

FENG, S. et al. Cleavage of RIP3 inactivates its caspase-independent apoptosis pathway by removal of kinase domain. **Cell Signal**, v. 19, n. 10, p. 2056-67, Oct 2007. ISSN 0898-6568. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17644308> >.

FU, Z.; TINDALL, D. J. FOXOs, cancer and regulation of apoptosis. **Oncogene**, v. 27, n. 16, p. 2312-9, Apr 2008. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18391973> >.

GEMBARSKA, A. et al. MDM4 is a key therapeutic target in cutaneous melanoma. **Nat Med**, v. 18, n. 8, p. 1239-47, Aug 2012. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22820643> >.

GENG, C. D.; SCHWARTZ, J. R.; VEDECKIS, W. V. A conserved molecular mechanism is responsible for the auto-up-regulation of glucocorticoid receptor gene promoters. **Mol Endocrinol**, v. 22, n. 12, p. 2624-42, Dec 2008. ISSN 0888-8809. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18945813> >.

GROB, T. J. et al. Human delta Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. **Cell Death Differ**, v. 8, n. 12, p. 1213-23, Dec 2001. ISSN 1350-9047. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11753569> >.

HAINAUT, P. et al. IARC Database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisation tools. **Nucleic Acids**

Res, v. 26, n. 1, p. 205-13, Jan 1998. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9399837> >.

HASAN, M. K. et al. CARF is a novel protein that cooperates with mouse p19ARF (human p14ARF) in activating p53. **J Biol Chem**, v. 277, n. 40, p. 37765-70, Oct 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12154087> >.

HERBERG, J. A.; BECK, S.; TROWSDALE, J. TAPASIN, DAXX, RGL2, HKE2 and four new genes (BING 1, 3 to 5) form a dense cluster at the centromeric end of the MHC. **J Mol Biol**, v. 277, n. 4, p. 839-57, Apr 1998. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9545376> >.

HEUCK, C. J. et al. Thalidomide in total therapy 2 overcomes inferior prognosis of myeloma with low expression of the glucocorticoid receptor gene NR3C1. **Clin Cancer Res**, v. 18, n. 19, p. 5499-506, Oct 2012. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22855579> >.

HODI, F. S. et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. **N Engl J Med**, v. 363, n. 8, p. 711-23, Aug 2010. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20525992> >.

HONDA, R.; TANAKA, H.; YASUDA, H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. **FEBS Lett**, v. 420, n. 1, p. 25-7, Dec 1997. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9450543> >.

HORWOOD, N. J. et al. High-efficiency gene transfer into nontransformed cells: utility for studying gene regulation and analysis of potential therapeutic targets. **Arthritis Res**, v. 4 Suppl 3, p. S215-25, 2002. ISSN 1465-9905. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12110141> >.

HU, G.; MANCL, M. E.; BARNES, B. J. Signaling through IFN regulatory factor-5 sensitizes p53-deficient tumors to DNA damage-induced apoptosis and cell death.

Cancer Res, v. 65, n. 16, p. 7403-12, Aug 2005. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16103093> >.

HUANG, Q. et al. Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. **Nat Med**, v. 17, n. 7, p. 860-6, Jul 2011. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21725296> >.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 4, p. 277-88, Apr 2002. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12001989> >.

INABA, H.; PUI, C. H. Glucocorticoid use in acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet Oncol**, v. 11, n. 11, p. 1096-106, Nov 2010. ISSN 1474-5488. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20947430> >.

JACKSON, M. W.; LINDSTROM, M. S.; BERBERICH, S. J. MdmX binding to ARF affects Mdm2 protein stability and p53 transactivation. **J Biol Chem**, v. 276, n. 27, p. 25336-41, Jul 2001. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11297540> >.

JOHNS, T. G. et al. Antiproliferative potencies of interferons on melanoma cell lines and xenografts: higher efficacy of interferon beta. **J Natl Cancer Inst**, v. 84, n. 15, p. 1185-90, Aug 1992. ISSN 0027-8874. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1378904> >.

KABEYA, Y. et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. **EMBO J**, v. 19, n. 21, p. 5720-8, Nov 2000. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11060023> >.

KAMIJO, T. et al. Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 14, p. 8292-7, Jul 1998. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9653180> >.

KANTARJIAN, H. M. et al. Survival benefit with imatinib mesylate versus interferon-alpha-based regimens in newly diagnosed chronic-phase chronic myelogenous leukemia. **Blood**, v. 108, n. 6, p. 1835-40, Sep 2006. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16709931> >.

KARAYAN, L. et al. Human ARF protein interacts with topoisomerase I and stimulates its activity. **Oncogene**, v. 20, n. 7, p. 836-48, Feb 2001. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11314011> >.

KAVANAGH, D. et al. Adjuvant therapies in the treatment of stage II and III malignant melanoma. **Surgeon**, v. 3, n. 4, p. 245-56, Aug 2005. ISSN 1479-666X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16121769> >.

KAWASE, T. et al. PH domain-only protein PHLDA3 is a p53-regulated repressor of Akt. **Cell**, v. 136, n. 3, p. 535-50, Feb 2009. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19203586> >.

KERLEY-HAMILTON, J. S. et al. A p53-dominant transcriptional response to cisplatin in testicular germ cell tumor-derived human embryonal carcinoma. **Oncogene**, v. 24, n. 40, p. 6090-100, Sep 2005. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15940259> >.

KIM, Y. K.; AHN, S. K.; LEE, M. Differential sensitivity of melanoma cell lines with differing B-Raf mutational status to the new oncogenic B-Raf kinase inhibitor UI-152. **Cancer Lett**, v. 320, n. 2, p. 215-24, Jul 2012. ISSN 1872-7980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22425959> >.

KIRKWOOD, J. M. et al. High- and low-dose interferon alfa-2b in high-risk melanoma: first analysis of intergroup trial E1690/S9111/C9190. **J Clin Oncol**, v. 18, n. 12, p. 2444-58, Jun 2000. ISSN 0732-183X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10856105> >.

KOPS, G. J.; BURGERING, B. M. Forkhead transcription factors: new insights into protein kinase B (c-akt) signaling. **J Mol Med (Berl)**, v. 77, n. 9, p. 656-65, Sep 1999. ISSN 0946-2716. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10569203> >.

KOTENKO, S. V. IFN- λ s. **Curr Opin Immunol**, v. 23, n. 5, p. 583-90, Oct 2011. ISSN 1879-0372. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21840693> >.

KRAMER, S. et al. Protein stability and function of p73 are modulated by a physical interaction with RanBPM in mammalian cultured cells. **Oncogene**, v. 24, n. 5, p. 938-44, Jan 2005. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15558019> >.

KREUTZER, K. et al. [Sarcoidosis, myasthenia gravis and anterior ischaemic optic neuropathy: severe side effects of adjuvant interferon-alpha-therapy in malignant melanoma?]. **J Dtsch Dermatol Ges**, v. 2, n. 8, p. 689-94, Aug 2004. ISSN 1610-0379. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16279234> >.

KROEMER, G. et al. Immunogenic cell death in cancer therapy. **Annu Rev Immunol**, v. 31, p. 51-72, 2013. ISSN 1545-3278. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23157435> >.

_____. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death Differ**, v. 16, n. 1, p. 3-11, Jan 2009. ISSN 1476-5403. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18846107> >.

LAMB, C. A.; YOSHIMORI, T.; TOOZE, S. A. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 14, n. 12, p. 759-74, Dec 2013. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24201109> >.

LEAMAN, D. W. et al. Novel growth and death related interferon-stimulated genes (ISGs) in melanoma: greater potency of IFN-beta compared with IFN-alpha2. **J Interferon Cytokine Res**, v. 23, n. 12, p. 745-56, Dec 2003. ISSN 1079-9907. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14769151> >.

LEE, C. W.; LA THANGUE, N. B. Promoter specificity and stability control of the p53-related protein p73. **Oncogene**, v. 18, n. 29, p. 4171-81, Jul 1999. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10435630> >.

LESTERHUIS, W. J.; HAANEN, J. B.; PUNT, C. J. Cancer immunotherapy--revisited. **Nat Rev Drug Discov**, v. 10, n. 8, p. 591-600, Aug 2011. ISSN 1474-1784. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21804596> >.

LEVINE, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. **Cell**, v. 88, n. 3, p. 323-31, Feb 1997. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9039259> >.

LEVINE, A. J.; FINLAY, C. A.; HINDS, P. W. P53 is a tumor suppressor gene. **Cell**, v. 116, n. 2 Suppl, p. S67-9, 1 p following S69, Jan 2004. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15055586> >.

LEVINE, B.; YUAN, J. Autophagy in cell death: an innocent convict? **J Clin Invest**, v. 115, n. 10, p. 2679-88, Oct 2005. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16200202> >.

LI, X. et al. Abnormal MDMX degradation in tumor cells due to ARF deficiency. **Oncogene**, v. 31, n. 32, p. 3721-32, Aug 2012. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22120712> >.

LINSLEY, P. S. et al. Copy number loss of the interferon gene cluster in melanomas is linked to reduced T cell infiltrate and poor patient prognosis. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e109760, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25314013> >.

LOCKSLEY, R. M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 487-501, Feb 2001. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11239407> >.

LOTRICH, F. E. Major depression during interferon-alpha treatment: vulnerability and prevention. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 11, n. 4, p. 417-25, 2009. ISSN 1294-8322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20135899> >.

LOWE, S. W.; RULEY, H. E. Stabilization of the p53 tumor suppressor is induced by adenovirus 5 E1A and accompanies apoptosis. **Genes Dev**, v. 7, n. 4, p. 535-45, Apr 1993. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8384579> >.

LOWE, S. W. et al. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. **Cell**, v. 74, n. 6, p. 957-67, Sep 1993. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8402885> >.

_____. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. **Nature**, v. 362, n. 6423, p. 847-9, Apr 1993. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8479522> >.

MAEHAMA, T.; DIXON, J. E. PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. **Trends Cell Biol**, v. 9, n. 4, p. 125-8, Apr 1999. ISSN 0962-8924. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10203785> >.

MANN, S. S.; HAMMARBACK, J. A. Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding subunit of MAP1A and MAP1B. **J Biol Chem**, v. 269, n. 15, p. 11492-7, Apr 1994. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7908909> >.

MATSUOKA, S. et al. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. **Science**, v. 316, n. 5828, p. 1160-6, May 2007. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17525332> >.

MATSUZAKI, H. et al. Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 20, p. 11285-90, Sep

2003. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13679577> >.

MEDRANO, R. F. et al. Vaccination using melanoma cells treated with p19arf and interferon beta gene transfer in a mouse model: a novel combination for cancer immunotherapy. **Cancer Immunol Immunother**, Feb 2016. ISSN 1432-0851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26887933> >.

MERKEL, C. A. et al. Activation of endogenous p53 by combined p19Arf gene transfer and nutlin-3 drug treatment modalities in the murine cell lines B16 and C6. **BMC Cancer**, v. 10, p. 316, 2010. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20569441 >.

_____. Combined p19Arf and interferon-beta gene transfer enhances cell death of B16 melanoma in vitro and in vivo. **Cancer Gene Ther**, v. 20, n. 5, p. 317-25, May 2013. ISSN 1476-5500. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23618951> >.

MICHEAU, O.; TSCHOPP, J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. **Cell**, v. 114, n. 2, p. 181-90, Jul 2003. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12887920> >.

MIKOLAJCZYK, M. et al. The cyclin-dependent kinase 11(p46) isoform interacts with RanBPM. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 310, n. 1, p. 14-8, Oct 2003. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14511641> >.

MIYASHITA, T. et al. Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. **Cancer Res**, v. 54, n. 12, p. 3131-5, Jun 1994. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8205530> >.

MIZUGUCHI, H. et al. A simplified system for constructing recombinant adenoviral vectors containing heterologous peptides in the HI loop of their fiber knob. **Gene Ther**, v. 8, n. 9, p. 730-5, May 2001. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11406768 >.

MIZUSHIMA, N.; YOSHIMORI, T. How to interpret LC3 immunoblotting. **Autophagy**, v. 3, n. 6, p. 542-5, 2007 Nov-Dec 2007. ISSN 1554-8627. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17611390> >.

MOCELLIN, S. et al. Interferon alpha adjuvant therapy in patients with high-risk melanoma: a systematic review and meta-analysis. **J Natl Cancer Inst**, v. 102, n. 7, p. 493-501, Apr 2010. ISSN 1460-2105. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20179267> >.

MOISEEVA, O. et al. DNA damage signaling and p53-dependent senescence after prolonged beta-interferon stimulation. **Mol Biol Cell**, v. 17, n. 4, p. 1583-92, Apr 2006. ISSN 1059-1524. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16436515> >.

MOMAND, J. et al. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. **Cell**, v. 69, n. 7, p. 1237-45, Jun 1992. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1535557> >.

MORI, T. et al. Identification of the interferon regulatory factor 5 gene (IRF-5) as a direct target for p53. **Oncogene**, v. 21, n. 18, p. 2914-8, Apr 2002. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11973653> >.

MOSCHELLA, F. et al. Cyclophosphamide induces a type I interferon-associated sterile inflammatory response signature in cancer patients' blood cells: implications for cancer chemoimmunotherapy. **Clin Cancer Res**, v. 19, n. 15, p. 4249-61, Aug 2013. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23759676> >.

MUTHUSAMY, V. et al. Amplification of CDK4 and MDM2 in malignant melanoma. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 45, n. 5, p. 447-54, May 2006. ISSN 1045-2257. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16419059> >.

NAKANO, K.; VOUSDEN, K. H. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. **Mol Cell**, v. 7, n. 3, p. 683-94, Mar 2001. ISSN 1097-2765. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11463392> >.

NATSUME, A. et al. Antitumor effect and cellular immunity activation by murine interferon-beta gene transfer against intracerebral glioma in mouse. **Gene Ther**, v. 6, n. 9, p. 1626-33, Sep 1999. ISSN 0969-7128. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10490773> >.

_____. IFN-beta gene therapy induces systemic antitumor immunity against malignant glioma. **J Neurooncol**, v. 47, n. 2, p. 117-24, Apr 2000. ISSN 0167-594X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10982152> >.

ONGKEKO, W. M. et al. MDM2 and MDMX bind and stabilize the p53-related protein p73. **Curr Biol**, v. 9, n. 15, p. 829-32, 1999 Jul 29-Aug 12 1999. ISSN 0960-9822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10469568> >.

PALMERO, I. et al. Activation of ARF by oncogenic stress in mouse fibroblasts is independent of E2F1 and E2F2. **Oncogene**, v. 21, n. 19, p. 2939-47, May 2002. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12082524> >.

PAPIN, S. et al. The SPRY domain of Pyrin, mutated in familial Mediterranean fever patients, interacts with inflammasome components and inhibits proIL-1beta processing. **Cell Death Differ**, v. 14, n. 8, p. 1457-66, Aug 2007. ISSN 1350-9047. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17431422> >.

PINYOL, M. et al. INK4a/ARF locus alterations in human non-Hodgkin's lymphomas mainly occur in tumors with wild-type p53 gene. **Am J Pathol**, v. 156, n. 6, p. 1987-96, Jun 2000. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10854221> >.

PIOVAN, E. et al. Direct reversal of glucocorticoid resistance by AKT inhibition in acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Cell**, v. 24, n. 6, p. 766-76, Dec 2013. ISSN 1878-3686. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24291004> >.

POLSKY, D. et al. HDM2 protein overexpression, but not gene amplification, is related to tumorigenesis of cutaneous melanoma. **Cancer Res**, v. 61, n. 20, p. 7642-6, Oct 2001. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11606406> >.

PORTA, C. et al. Interferons alpha and gamma induce p53-dependent and p53-independent apoptosis, respectively. **Oncogene**, v. 24, n. 4, p. 605-15, Jan 2005. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15580300> >.

RAMAMOORTHY, S.; CIDLOWSKI, J. A. Exploring the molecular mechanisms of glucocorticoid receptor action from sensitivity to resistance. **Endocr Dev**, v. 24, p. 41-56, 2013. ISSN 1662-2979. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23392094> >.

RAVANDI, F. et al. A phase I study of recombinant interferon-beta in patients with advanced malignant disease. **Clin Cancer Res**, v. 5, n. 12, p. 3990-8, Dec 1999. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10632330> >.

_____. Phase II trial of 5-fluorouracil, folinic acid and recombinant alpha-2a-interferon in patients with advanced colorectal cancer. **Anticancer Drugs**, v. 10, n. 6, p. 519-24, Jul 1999. ISSN 0959-4973. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10885898> >.

REDER, A. T. et al. IFN-beta1b induces transient and variable gene expression in relapsing-remitting multiple sclerosis patients independent of neutralizing antibodies or changes in IFN receptor RNA expression. **J Interferon Cytokine Res**, v. 28, n. 5, p. 317-31, May 2008. ISSN 1079-9907. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18547162> >.

REN, J. et al. p73beta is regulated by protein kinase Cdelta catalytic fragment generated in the apoptotic response to DNA damage. **J Biol Chem**, v. 277, n. 37, p. 33758-65, Sep 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12097319> >.

RHODES, D. A.; DE BONO, B.; TROWSDALE, J. Relationship between SPRY and B30.2 protein domains. Evolution of a component of immune defence? **Immunology**, v. 116, n. 4, p. 411-7, Dec 2005. ISSN 0019-2805. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16313355> >.

ROBERT, C. et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. **N Engl J Med**, v. 372, n. 26, p. 2521-32, Jun 2015. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25891173> >.

ROESCH, A. Tumor heterogeneity and plasticity as elusive drivers for resistance to MAPK pathway inhibition in melanoma. **Oncogene**, v. 34, n. 23, p. 2951-7, Jun 2015. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25109330> >.

ROSENBERG, S. A. et al. Identification of BING-4 cancer antigen translated from an alternative open reading frame of a gene in the extended MHC class II region using lymphocytes from a patient with a durable complete regression following immunotherapy. **J Immunol**, v. 168, n. 5, p. 2402-7, Mar 2002. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11859131> >.

_____. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. **Nat Med**, v. 4, n. 3, p. 321-7, Mar 1998. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9500606> >.

ROY-CHOWDHURY, J.; HORWITZ, M. S. Evolution of adenoviruses as gene therapy vectors. **Mol Ther**, v. 5, n. 4, p. 340-4, Apr 2002. ISSN 1525-0016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11945059> >.

RUSSELL, W. C. Update on adenovirus and its vectors. **J Gen Virol**, v. 81, n. Pt 11, p. 2573-604, Nov 2000. ISSN 0022-1317. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11038369> >.

SAADATMANDI, N. et al. Growth suppression by a p14(ARF) exon 1beta adenovirus in human tumor cell lines of varying p53 and Rb status. **Cancer Gene Ther**, v. 9, n. 10, p. 830-9, Oct 2002. ISSN 0929-1903. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12224024> >.

SABEL, M. S.; SONDAK, V. K. Pros and cons of adjuvant interferon in the treatment of melanoma. **Oncologist**, v. 8, n. 5, p. 451-8, 2003. ISSN 1083-7159. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14530498> >.

SAKURAI, F. et al. Therapeutic effect of intravenous delivery of lipoplexes containing the interferon-beta gene and poly I: poly C in a murine lung metastasis model. **Cancer Gene Ther**, v. 10, n. 9, p. 661-8, Sep 2003. ISSN 0929-1903. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12944985> >.

SAKURAI, M. et al. Comparative study of the antitumor effect of two types of murine recombinant interferons, (beta) and (gamma), against B16-F10 melanoma. **Cancer Immunol Immunother**, v. 26, n. 2, p. 109-13, 1988. ISSN 0340-7004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3129191> >.

SALMON, P. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human interferon-beta in healthy male volunteers. **J Interferon Cytokine Res**, v. 16, n. 10, p. 759-64, Oct 1996. ISSN 1079-9907. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8910759> >.

SANDOVAL, R. et al. Different requirements for the cytostatic and apoptotic effects of type I interferons. Induction of apoptosis requires ARF but not p53 in osteosarcoma cell lines. **J Biol Chem**, v. 279, n. 31, p. 32275-80, Jul 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15169789> >.

SATO, M.; TANIGUCHI, T.; TANAKA, N. The interferon system and interferon regulatory factor transcription factors -- studies from gene knockout mice. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 12, n. 2-3, p. 133-42, 2001 Jun-Sep 2001. ISSN 1359-6101. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11325597> >.

SCHLOSSMACHER, G.; STEVENS, A.; WHITE, A. Glucocorticoid receptor-mediated apoptosis: mechanisms of resistance in cancer cells. **J Endocrinol**, v. 211, n. 1, p. 17-25, Oct 2011. ISSN 1479-6805. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21602312> >.

SCHREIBER, R. D.; OLD, L. J.; SMYTH, M. J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1565-70, Mar 2011. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21436444> >.

SCHWARTZENTRUBER, D. J. et al. gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma. **N Engl J Med**, v. 364, n. 22, p. 2119-27, Jun 2011. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21631324> >.

SHARPLESS, E.; CHIN, L. The INK4a/ARF locus and melanoma. **Oncogene**, v. 22, n. 20, p. 3092-8, May 2003. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12789286> >.

SHIEH, S. Y. et al. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. **Cell**, v. 91, n. 3, p. 325-34, Oct 1997. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9363941> >.

SHVARTS, A. et al. MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2. **EMBO J**, v. 15, n. 19, p. 5349-57, Oct 1996. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8895579> >.

SILKE, J.; BRINK, R. Regulation of TNFRSF and innate immune signalling complexes by TRAFs and cIAPs. **Cell Death Differ**, v. 17, n. 1, p. 35-45, Jan 2010. ISSN 1476-5403. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19680262> >.

SISTIGU, A. et al. Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy. **Nat Med**, v. 20, n. 11, p. 1301-9, Nov 2014. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25344738> >.

STRAUSS, B. E.; BAJGELMAN, M. C.; COSTANZI-STRAUSS, E. A novel gene transfer strategy that combines promoter and transgene activities for improved tumor cell inhibition. **Cancer Gene Ther**, v. 12, n. 12, p. 935-46, Dec 2005. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15905860 >.

STRAUSS, B. E.; COSTANZI-STRAUSS, E. pCLPG: a p53-driven retroviral system. **Virology**, v. 321, n. 2, p. 165-72, Apr 10 2004. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15051377 >.

STRAUSS, B. E. et al. The MDR1 downstream promoter contains sequence-specific binding sites for wild-type p53. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 217, n. 3, p. 825-31, Dec 1995. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8554604> >.

TAKAOKA, A. et al. Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. **Nature**, v. 424, n. 6948, p. 516-23, Jul 2003. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12872134> >.

TESTA, J. R.; BELLACOSA, A. Membrane translocation and activation of the Akt kinase in growth factor-stimulated hematopoietic cells. **Leuk Res**, v. 21, n. 11-12, p. 1027-31, 1997 Nov-Dec 1997. ISSN 0145-2126. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9444935> >.

_____. AKT plays a central role in tumorigenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 20, p. 10983-5, Sep 2001. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11572954> >.

TSUJI, K. et al. p53-independent apoptosis is induced by the p19ARF tumor suppressor. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 295, n. 3, p. 621-9, Jul 2002. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12099684> >.

TSUJIMOTO, Y.; SHIMIZU, S. Another way to die: autophagic programmed cell death. **Cell Death Differ**, v. 12 Suppl 2, p. 1528-34, Nov 2005. ISSN 1350-9047. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16247500> >.

ULASOV, I. V. et al. Targeting adenovirus to CD80 and CD86 receptors increases gene transfer efficiency to malignant glioma cells. **J Neurosurg**, v. 107, n. 3, p. 617-27, Sep 2007. ISSN 0022-3085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17886563> >.

URBICH, C. et al. FOXO-dependent expression of the proapoptotic protein Bim: pivotal role for apoptosis signaling in endothelial progenitor cells. **FASEB J**, v. 19, n. 8, p. 974-6, Jun 2005. ISSN 1530-6860. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15824087> >.

VANDENABEELE, P. et al. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 11, n. 10, p. 700-14, Oct 2010. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20823910> >.

WALTER, L.; GÜNTHER, E. Physical mapping and evolution of the centromeric class I gene-containing region of the rat MHC. **Immunogenetics**, v. 51, n. 10, p. 829-37, Aug 2000. ISSN 0093-7711. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10970097> >.

WANG, X. et al. MDM2 and MDMX can interact differently with ARF and members of the p53 family. **FEBS Lett**, v. 490, n. 3, p. 202-8, Feb 2001. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11223036> >.

WANG, Z. et al. Microarray analysis uncovers the induction of the proapoptotic BH3-only protein Bim in multiple models of glucocorticoid-induced apoptosis. **J Biol Chem**, v. 278, n. 26, p. 23861-7, Jun 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12676946> >.

WEBER, J. D. et al. p53-independent functions of the p19(ARF) tumor suppressor. **Genes Dev**, v. 14, n. 18, p. 2358-65, Sep 2000. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10995391> >.

WOO, S. R. et al. STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors. **Immunity**, v. 41, n. 5, p. 830-42, Nov 2014. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25517615> >.

YAMASHITA, M. et al. Expression of coxsackie and adenovirus receptor reduces the lung metastatic potential of murine tumor cells. **Int J Cancer**, v. 121, n. 8, p. 1690-6, Oct 15 2007. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17546646 >.

YOSHIDA, J.; MIZUNO, M.; WAKABAYASHI, T. Interferon-beta gene therapy for cancer: basic research to clinical application. **Cancer Sci**, v. 95, n. 11, p. 858-65, Nov 2004. ISSN 1347-9032. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15546502> >.

ZHANG, D. W. et al. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. **Science**, v. 325, n. 5938, p. 332-6, Jul 2009. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19498109> >.

ZHANG, L. H. et al. Lenalidomide efficacy in activated B-cell-like subtype diffuse large B-cell lymphoma is dependent upon IRF4 and cereblon expression. **Br J Haematol**, v. 160, n. 4, p. 487-502, Feb 2013. ISSN 1365-2141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23252516> >.

ZHANG, X. et al. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1813, n. 11, p. 1978-86, Nov 2011. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21440011> >.

ZHANG, Y.; XIONG, Y.; YARBROUGH, W. G. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. **Cell**, v. 92, n. 6, p. 725-34, Mar 1998. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9529249> >.

ZITVOGEL, L. et al. Type I interferons in anticancer immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 15, n. 7, p. 405-14, Jul 2015. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26027717> >.

Anexo A - Rede de interação proteína-proteína dos genes menos expressos pelo tratamento combinado de p19Arf + IFN β e relacionados à função de ciclo celular.

Formato de losango = genes brokers; formato de V = genes bridges; formato quadrado = sem função específica; coloração verde = genes downregulados pela combinação p19Arf + IFN β ; coloração cinza = sem alteração na expressão gênica.

Anexo C - Rede de interação proteína-proteína dos genes mais expressos pelo tratamento combinado de p19Arf + IFN β e relacionados à função de reparo de DNA.

Formato de losango = genes brokers; formato de V = genes bridges; formato quadrado = sem função específica; coloração vermelha = genes upregulados pela combinação p19Arf + IFN β ; coloração cinza = sem alteração na expressão gênica.

Formato de losango = genes brokers; formato de V = genes bridges; formato quadrado = sem função específica; coloração vermelha = genes upregulados pela combinação p19Arf + IFN β ; coloração cinza = sem alteração na expressão gênica.

Anexo E - Rede de interação proteína-proteína dos genes menos expressos pelo tratamento combinado de p19Arf + IFN β e relacionados à função de adesão celular.

Formato de losango = genes brokers; formato de V = genes bridges; formato quadrado = sem função específica; coloração verde = genes downregulados pela combinação p19Arf + IFN β ; coloração cinza = sem alteração na expressão gênica.

Anexo F - Rede de interação proteína-proteína dos genes menos expressos pelo tratamento combinado de p19Arf + IFN β e relacionados à função de modelamento e organização da cromatina.

Formato de losango = genes brokers; formato de V = genes bridges; formato quadrado = sem função específica; coloração verde = genes downregulados pela combinação p19Arf + IFN β ; coloração cinza = sem alteração na expressão gênica.

Anexo G - Rede de interação proteína-proteína dos genes mais expressos pelo tratamento combinado de p19Arf + IFN β e relacionados à função de regulação da transcrição gênica.

Formato de losango = genes brokers; formato de V = genes bridges; formato quadrado = sem função específica; coloração verde = genes downregulados pela combinação p19Arf + IFN β ; coloração cinza = sem alteração na expressão gênica.

Anexo H - Rede de interação proteína-proteína dos genes menos expressos pelo tratamento combinado de p19Arf + IFN β e relacionados à função de respiração celular.

Formato de losango = genes brokers; formato de V = genes bridges; formato quadrado = sem função específica; coloração verde = genes downregulados pela combinação p19Arf + IFN β ; coloração cinza = sem alteração na expressão gênica.

Anexo I - Função relacionada à regulação de morte celular enriquecida com os genes mais expressos exclusivamente após tratamento com a combinação de p19Arf + IFN β . Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.7.

Term	PValue	Genes
GO:0043065~positive regulation of apoptosis	0.003008	TRP53, CEBPB, RAD9, NR3C1, SAP30BP, PRKCD, BCL2L11, VDR, EI24, NOTCH1, PTPRV, PPP1R13B, FAS, DCUN1D3, PHLDA3
GO:0043068~positive regulation of programmed cell death	0.003235	TRP53, CEBPB, RAD9, NR3C1, SAP30BP, PRKCD, BCL2L11, VDR, EI24, NOTCH1, PTPRV, PPP1R13B, FAS, DCUN1D3, PHLDA3
GO:0010942~positive regulation of cell death	0.003477	TRP53, CEBPB, RAD9, NR3C1, SAP30BP, PRKCD, BCL2L11, VDR, EI24, NOTCH1, PTPRV, PPP1R13B, FAS, DCUN1D3, PHLDA3
GO:0042981~regulation of apoptosis	0.004135	JAG2, FOXO1, NR3C1, RAD9, VDR, AKT1S1, RRN3, FAS, DLG5, PHLDA3, TRP53, CEBPB, NOL3, POLB, SAP30BP, SIRT1, PRKCD, BCL2L11, NOTCH1, EI24, BTG2, PTPRV, PPP1R13B, TRP73, DCUN1D3
GO:0043067~regulation of programmed cell death	0.004844	JAG2, FOXO1, NR3C1, RAD9, VDR, AKT1S1, RRN3, FAS, DLG5, PHLDA3, TRP53, CEBPB, NOL3, POLB, SAP30BP, SIRT1, PRKCD, BCL2L11, NOTCH1, EI24, BTG2, PTPRV, PPP1R13B, TRP73, DCUN1D3
GO:0010941~regulation of cell death	0.005197	JAG2, FOXO1, NR3C1, RAD9, VDR, AKT1S1, RRN3, FAS, DLG5, PHLDA3, TRP53, CEBPB, NOL3, POLB, SAP30BP, SIRT1, PRKCD, BCL2L11, NOTCH1, EI24, BTG2, PTPRV, PPP1R13B, TRP73, DCUN1D3
Apoptosis	0.003116	STEAP3, TRP53, DFFB, LRDD, 4632434I11RIK, RNF216, SAP30BP, PPP1R13L, SIRT1, BCL2L11, EPHA2, TNFRSF1A, SLC5A8, CYFIP2, PPP1R13B, FAS, TRP73, PHLDA3, BLCAP
GO:0012501~programmed cell death	0.011228	STEAP3, TRP53, DFFB, LRDD, 4632434I11RIK, EDA2R, RNF216, SAP30BP, SIRT1, PPP1R13L, BCL2L11, TNFRSF1A, JMJD6, SLC5A8, CYFIP2, PPP1R13B, FAS, MDM4, TRP73, PHLDA3, BLCAP
GO:0008219~cell death	0.012041	STEAP3, TRP53, DFFB, LRDD, 4632434I11RIK, EDA2R, POLB, RNF216, SAP30BP, PPP1R13L, SIRT1, BCL2L11, TNFRSF1A, JMJD6, SLC5A8, CYFIP2, PPP1R13B, FAS, MDM4, TRP73, PHLDA3, BLCAP
GO:0016265~death	0.014477	STEAP3, TRP53, DFFB, LRDD, 4632434I11RIK, EDA2R, POLB, RNF216, SAP30BP, PPP1R13L, SIRT1, BCL2L11, TNFRSF1A, JMJD6, SLC5A8, CYFIP2, PPP1R13B, FAS, MDM4, TRP73, PHLDA3, BLCAP
GO:0006915~apoptosis	0.019105	STEAP3, TRP53, DFFB, LRDD, 4632434I11RIK, RNF216, SAP30BP, SIRT1, PPP1R13L, BCL2L11, TNFRSF1A, JMJD6, SLC5A8, CYFIP2, PPP1R13B, FAS, MDM4, TRP73, PHLDA3, BLCAP

Anexo J - Função relacionada ao reparo de DNA enriquecida com os genes mais expressos exclusivamente após tratamento com a combinação de p19Arf + IFN β . Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.7.

Term	PValue	Genes
GO:0006974~response to DNA damage stimulus	6.99E-04	TRP53, POLK, TREX1, POLB, RAD9, MLH3, 5430437P03RIK, EYA4, MPG, ERCC8, ERCC5, BTG2, PTPRV, NSMCE2, TRP73, RAD51L3, PHLDA3, ATRIP
GO:0033554~cellular response to stress	9.31E-04	TRP53, POLK, TREX1, POLB, RAD9, MLH3, 5430437P03RIK, SIRT1, EYA4, MPG, ERCC8, ERCC5, MYD88, BTG2, PTPRV, NSMCE2, MAPK8IP3, TRP73, RAD51L3, PHLDA3, MAPKBP1, ATRIP
GO:0006281~DNA repair	0.003148	TRP53, POLK, TREX1, POLB, RAD9, MLH3, 5430437P03RIK, EYA4, MPG, ERCC8, ERCC5, NSMCE2, RAD51L3, ATRIP
dna repair	0.014505	EYA4, MPG, POLK, ERCC5, NSMCE2, TREX1, POLB, RAD51L3, RAD9, 5430437P03RIK, ATRIP
GO:0006259~DNA metabolic process	0.021399	TRP53, POLK, DFFB, TREX1, POLB, RAD9, MLH3, TOP1MT, 5430437P03RIK, EYA4, MPG, ERCC8, ERCC5, WRAP53, NSMCE2, RAD51L3, ATRIP, REPIN1
DNA damage	0.029493	EYA4, MPG, POLK, ERCC5, NSMCE2, TREX1, POLB, RAD51L3, RAD9, 5430437P03RIK, ATRIP

Anexo K - Função relacionada à regulação da transcrição gênica enriquecida com os genes mais expressos exclusivamente após tratamento com a combinação de p19Arf + IFN β . Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.7.

Term	PValue	Genes
nucleus	3.22E-07	FOXO1, ITPKC, RAD9, REST, CFBF, CNOT4, GABPB1, MAK16, CLK3, EED, SMOX, POLK, ZFP692, DFFB, FAM192A, 4632434I11RIK, GRHL3, HMG20B, POLB, ARNTL, H2AFJ, SIX4, AQR, PIAS3, JUN, MED17, TRP73, ZFP511, ELL, MAPKAPK3, MYBL1, CCNG1, ZFP563, ZFP456, VDR, ARIH2, BRIX1, RAD51L3, RCHY1, ARNTL2, ATRIP, TRP53, TSEN54, ESRRA, CCDC86, SETDB2, TAF6, SMAD7, AKAP8L, TREX1, SMAD3, ZFP777, SMAD2, MAFK, MED13L, ZSCAN2, TET1, FBXO38, NOTCH1, UPF3B, ATF3, RGS3, ZFP143, SMURF2, DNAJB1, POP5, UTP20, CCNDBP1, PHF8, NCOR2, AGTPBP1, LRDD, RPS19BP1, RANBP9, RRN3, HEY2, NSMCE2, CHUK, ZFP423, NOL3, FOXJ2, POLR1E, SNUPN, GM6907, TLE4, UBE2I, BANP, LPIN1, NRIP1, EYA4, WRAP53, ZFP869, MDM4, TRIOBP, AW146020, IRX5, ZFP69, ZFP398, TRA2A, ZFP68, NFYB, ZFP498, ABI1, NR3C1, CIC, 5430437P03RIK, TRIM11, ERCC8, ERCC5, NR1D1, THYN1, PLCD4, THAP1, BCL9L, SH2B1, ZSCAN29, PPWD1, NFATC1, ETV3, FAM50A, 4933407C03RIK, DGKQ, CEBPB, ZFP672, SYNPO2, SAP30BP, SIRT1, PPP1R13L, 2700050L05RIK, IRF9, MPG, SNAI3, JMJD6, GRLF1, SH3BGRL2, ZBTB5, PPP1R13B, CENPT, IPPK, DUSP8, TRIT1, RBM17, REPIN1, CBS
GO:0006350 ~transcription	2.22E-06	FOXO1, REST, CNOT4, GABPB1, RRN3, HEY2, EED, ZFP423, ZFP692, POLR1E, FOXJ2, TAF4B, GM6907, TLE4, GRHL3, HMG20B, BANP, ARNTL, NRIP1, EYA4, ASCC2, BTG2, PIAS3, MED17, JUN, ZFP869, TRP73, ZFP511, AW146020, ELL, ZFP69, ZFP68, ZFP398, NFYB, ZFP498, MYBL1, NR3C1, CIC, ZFP563, ZFP456, ERCC8, VDR, NR1D1, THAP1, BCL9L, ARNTL2, ZSCAN29, NFATC1, ETV3, TRP53, ESRRA, CEBPB, TAF6, SMAD7, ZFP672, SMAD3, ZFP777, SMAD2, SAP30BP, MED13L, MAFK, 2700050L05RIK, ZSCAN2, PPP1R13L, SIRT1, IRF9, SNAI3, NOTCH1, ATF3, JMJD6, ZFP143, GRLF1, ZBTB5, NCOR2
GO:0045449 ~regulation of transcription	7.53E-06	FOXO1, REST, CFBF, CNOT4, GABPB1, MYD88, HEY2, EED, ZFP423, ZFP692, FOXJ2, GM6907, TLE4, GRHL3, HMG20B, BANP, ARNTL, SIX4, NFAM1, NRIP1, EYA4, ASCC2, BTG2, PIAS3, JUN, MED17, ZFP869, MDM4, TRP73, ZFP511, AW146020, IRX5, ELL, ZFP69, ZFP68, ZFP398, ITGB2, NFYB, ZFP498, MYBL1, NR3C1, CIC, ZFP563, ZFP456, LIF, ERCC8, VDR, TNFRSF1A, NR1D1, BCL9L, THAP1, ARNTL2, ZSCAN29, NFATC1, ETV3, TRP53, ESRRA, CEBPB, TAF6, SMAD7, PSRC1, EDA2R, ZFP672, SMAD3, ZFP777, SMAD2, SAP30BP, MED13L, MAFK, 2700050L05RIK, SIRT1, ZSCAN2, PPP1R13L, IRF9, NOTCH1, SNAI3, UPF3B, ATF3, JMJD6, ZFP143, GRLF1, ZBTB5, JAK3, ARAP1, NCOR2
Transcription	1.45E-05	FOXO1, REST, CNOT4, GABPB1, RRN3, HEY2, EED, ZFP423, ZFP692, POLR1E, FOXJ2, GM6907, TLE4, GRHL3, HMG20B, BANP, ARNTL, LPIN1, NRIP1, EYA4, ASCC2, BTG2, PIAS3, MED17, JUN, ZFP869, TRP73, ZFP511, AW146020, ELL, ZFP69, ZFP68, ZFP398, NFYB, ZFP498, MYBL1, NR3C1, CIC, ZFP563, ZFP456, ERCC8, VDR, NR1D1, THAP1, BCL9L, ARNTL2, ZSCAN29, NFATC1, ETV3, TRP53, ESRRA, CEBPB, TAF6, SMAD7, ZFP672, SMAD3, ZFP777, SMAD2, SAP30BP, MED13L, MAFK, 2700050L05RIK, ZSCAN2, PPP1R13L, SIRT1, IRF9,

		SNAI3, NOTCH1, ATF3, JMJD6, ZFP143, GRLF1, ZBTB5, PHF8, NCOR2
transcription regulation	1.73E-05	FOXO1, REST, CNOT4, GABPB1, RRN3, HEY2, EED, ZFP423, ZFP692, FOXJ2, GM6907, TLE4, GRHL3, BANP, HMG20B, ARNTL, SIX4, LPIN1, NRIP1, EYA4, BTG2, ASCC2, PIAS3, MED17, JUN, TRP73, ZFP511, AW146020, ELL, ZFP498, NFYB, MYBL1, NR3C1, CIC, ERCC8, VDR, NR1D1, THAP1, BCL9L, ARNTL2, ZSCAN29, ETV3, NFATC1, TRP53, ESRRA, CEBPB, TAF6, SMAD7, ZFP672, SMAD3, SMAD2, SAP30BP, MED13L, MAFK, 2700050L05RIK, PPP1R13L, ZSCAN2, SIRT1, IRF9, SNAI3, NOTCH1, ATF3, JMJD6, ZFP143, GRLF1, ZBTB5, PHF8, NCOR2
GO:0003677 ~DNA binding	1.31E-04	FOXO1, REST, MLH3, HEY2, ZFP423, POLK, ZFP692, POLR1E, FOXJ2, DFFB, TLE4, GRHL3, BANP, POLB, HMG20B, ARNTL, TOP1MT, SIX4, H2AFJ, JUN, TRP73, ZFP511, AW146020, IRX5, ZFP498, NFYB, MYBL1, NR3C1, CIC, VDR, ERCC5, NR1D1, THAP1, ARNTL2, RAD51L3, ZSCAN29, ETV3, NFATC1, TRP53, ESRRA, SETDB2, CEBPB, TAF6, SMAD7, AKAP8L, SMAD3, ZFP672, TREX1, SMAD2, MAFK, ZSCAN2, TET1, IRF9, DOT1L, MPG, SNAI3, NOTCH1, UPF3B, ATF3, ZFP143, GRLF1, ZBTB5, CENPT, ARAP1, NCOR2, REPIN1
GO:0003700 ~transcription factor activity	3.20E-04	AW146020, IRX5, FOXO1, ZFP498, NFYB, NR3C1, VDR, NR1D1, HEY2, ARNTL2, ZSCAN29, ETV3, NFATC1, TRP53, ZFP423, ESRRA, CEBPB, FOXJ2, SMAD7, SMAD3, TLE4, SMAD2, HMG20B, ARNTL, SIX4, MAFK, ZSCAN2, IRF9, SNAI3, NOTCH1, UPF3B, ATF3, JUN, TRP73, ARAP1
GO:0030528 ~transcription regulator activity	6.73E-04	AW146020, IRX5, ELL, FOXO1, ZFP498, NFYB, MYBL1, REST, NR3C1, CBF, VDR, NR1D1, HEY2, THAP1, ARNTL2, ZSCAN29, NFATC1, ETV3, TRP53, ZFP423, ESRRA, CEBPB, TAF6, FOXJ2, SMAD7, TAF4B, SMAD3, TLE4, HMG20B, SMAD2, ARNTL, SIX4, MED13L, MAFK, ZSCAN2, SIRT1, NRIP1, IRF9, SNAI3, NOTCH1, UPF3B, ATF3, MED17, JUN, TRP73, ARAP1, NCOR2
GO:0051252 ~regulation of RNA metabolic process	0.001592	APOBEC1, FOXO1, REST, CBF, MYD88, HEY2, FOXJ2, TLE4, HMG20B, ARNTL, SIX4, NRIP1, MED17, JUN, ZFP869, MDM4, TRP73, IRX5, ZFP69, ZFP68, ZFP398, ZFP498, NFYB, NR3C1, ZFP563, ZFP456, LIF, TNFRSF1A, VDR, NR1D1, THAP1, ARNTL2, ZSCAN29, ETV3, NFATC1, TRP53, ESRRA, CEBPB, SMAD7, PSRC1, SMAD3, SMAD2, ZFP777, MED13L, MAFK, ZSCAN2, SIRT1, IRF9, SNAI3, NOTCH1, UPF3B, ATF3, JAK3, NCOR2
GO:0006355 ~regulation of transcription, DNA-dependent	0.001894	FOXO1, REST, CBF, MYD88, HEY2, FOXJ2, TLE4, HMG20B, ARNTL, SIX4, NRIP1, MED17, JUN, ZFP869, TRP73, MDM4, IRX5, ZFP69, ZFP68, ZFP398, ZFP498, NFYB, NR3C1, ZFP563, ZFP456, LIF, TNFRSF1A, VDR, NR1D1, THAP1, ARNTL2, ZSCAN29, ETV3, NFATC1, TRP53, ESRRA, CEBPB, SMAD7, PSRC1, SMAD3, SMAD2, ZFP777, MED13L, MAFK, ZSCAN2, SIRT1, IRF9, SNAI3, NOTCH1, UPF3B, ATF3, JAK3, NCOR2
GO:0043565 ~sequence-specific DNA binding	0.020564	ESRRA, CEBPB, IRX5, FOXJ2, TLE4, FOXO1, NFYB, SIX4, NR3C1, MLH3, MAFK, VDR, NOTCH1, UPF3B, ATF3, NR1D1, JUN, THAP1, ARAP1, NCOR2, ETV3, NFATC1
GO:0051173~positive regulation of nitrogen compound metabolic process	0.009527	TRP53, ESRRA, CEBPB, PSRC1, FOXO1, SMAD3, NFYB, GRHL3, SMAD2, ITGB2, ARNTL, SIX4, 5430437P03RIK, CBF, LIF, TNFRSF1A, NOTCH1, MYD88, JUN, MED17, TRP73, JAK3, ARAP1
GO:0045941~positive regulation of transcription	0.012737	TRP53, ESRRA, CEBPB, PSRC1, FOXO1, SMAD3, NFYB, GRHL3, SMAD2, ARNTL, SIX4, CBF, LIF, TNFRSF1A, NOTCH1, MYD88, JUN, MED17, TRP73, JAK3, ARAP1
GO:0045893~positive regulation of transcription, DNA-	0.013584	TRP53, ESRRA, CEBPB, PSRC1, FOXO1, SMAD3, NFYB, SMAD2, ARNTL, SIX4, CBF, LIF, TNFRSF1A, NOTCH1, MYD88, JUN, MED17, TRP73, JAK3

dependent		
GO:0045935~positive regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	0.013602	TRP53, ESRRA, CEBPB, PSRC1, FOXO1, SMAD3, NFYB, GRHL3, SMAD2, ARNTL, SIX4, 5430437P03RIK, CBFB, LIF, TNFRSF1A, NOTCH1, MYD88, JUN, MED17, TRP73, JAK3, ARAP1
GO:0051254~positive regulation of RNA metabolic process	0.014521	TRP53, ESRRA, CEBPB, PSRC1, FOXO1, SMAD3, NFYB, SMAD2, ARNTL, SIX4, CBFB, LIF, TNFRSF1A, NOTCH1, MYD88, JUN, MED17, TRP73, JAK3
GO:0031328~positive regulation of cellular biosynthetic process	0.015674	TRP53, ESRRA, CEBPB, TBK1, PSRC1, FOXO1, SMAD3, NFYB, GRHL3, SMAD2, ITGB2, ARNTL, SIX4, CBFB, LIF, TNFRSF1A, NOTCH1, MYD88, JUN, MED17, TRP73, JAK3, ARAP1
GO:0006357~regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	0.015942	FOXO1, CBFB, LIF, TNFRSF1A, MYD88, HEY2, ARNTL2, ETV3, TRP53, ESRRA, CEBPB, TLE4, SMAD3, SMAD2, SIX4, ARNTL, MED13L, SIRT1, NRIP1, NOTCH1, JUN, MED17, JAK3, MDM4, NCOR2
GO:0010628~positive regulation of gene expression	0.016034	TRP53, ESRRA, CEBPB, PSRC1, FOXO1, SMAD3, NFYB, GRHL3, SMAD2, ARNTL, SIX4, CBFB, LIF, TNFRSF1A, NOTCH1, MYD88, JUN, MED17, TRP73, JAK3, ARAP1
GO:0009891~positive regulation of biosynthetic process	0.016671	TRP53, ESRRA, CEBPB, TBK1, PSRC1, FOXO1, SMAD3, NFYB, GRHL3, SMAD2, ITGB2, ARNTL, SIX4, CBFB, LIF, TNFRSF1A, NOTCH1, MYD88, JUN, MED17, TRP73, JAK3, ARAP1
GO:0010557~positive regulation of macromolecule biosynthetic process	0.019315	TRP53, ESRRA, CEBPB, TBK1, PSRC1, FOXO1, SMAD3, NFYB, GRHL3, SMAD2, ARNTL, SIX4, CBFB, LIF, TNFRSF1A, NOTCH1, MYD88, JUN, MED17, TRP73, JAK3, ARAP1
GO:0010604~positive regulation of macromolecule metabolic process	0.01998	TBK1, FOXO1, NFYB, 5430437P03RIK, CBFB, LIF, TNFRSF1A, MYD88, TRP53, ESRRA, CEBPB, PSRC1, SMAD3, SMAD2, GRHL3, SIX4, ARNTL, NOTCH1, PIAS3, HPX, JUN, MED17, TRP73, JAK3, ARAP1
GO:0045944~positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	0.029523	TRP53, ESRRA, CEBPB, SMAD3, FOXO1, SMAD2, ARNTL, SIX4, CBFB, LIF, TNFRSF1A, NOTCH1, MYD88, JUN, MED17, JAK3

Anexo L - Função relacionada ao desenvolvimento embrionário enriquecida com os genes mais expressos exclusivamente após tratamento com a combinação de p19Arf + IFN β . Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.7.

Term	PValue	Genes
GO:0001701~in utero embryonic development	0.013355	TRP53, CEBPB, ELL, SMAD3, SMAD2, BCL2L11, LIF, NOTCH1, NDEL1, RRN3, PLCD3, MAPK8IP3, TCTN1, NCOR2
GO:0043009~chordate embryonic development	0.014204	TRP53, CEBPB, ELL, SMAD3, SMAD2, ABI1, SIX4, BCL2L11, EPHA2, LIF, NOTCH1, NDEL1, RRN3, PLCD3, GRLF1, MAPK8IP3, TCTN1, WNT9A, NCOR2
GO:0009792~embryonic development ending in birth or egg hatching	0.015555	TRP53, CEBPB, ELL, SMAD3, SMAD2, ABI1, SIX4, BCL2L11, EPHA2, LIF, NOTCH1, NDEL1, RRN3, PLCD3, GRLF1, MAPK8IP3, TCTN1, WNT9A, NCOR2

Anexo M - Função relacionada à ativação do sistema imune enriquecida com os genes mais expressos exclusivamente após tratamento com a combinação de p19Arf + IFN β . Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.7.

Term	PValue	Genes
GO:0046649~lymphocyte activation	0.01636	H60B, TRP53, JMJD6, JAG2, SMAD3, ITGB2, NFAM1, FAS, TSHR, PRKCD, CBFB
GO:0002520~immune system development	0.026552	TRP53, JAG2, SMAD3, TTC7, NFAM1, SIX4, CBFB, BCL2L11, CRKL, JMJD6, JAK3, FAS, TSHR, CHUK
GO:0001775~cell activation	0.034203	H60B, TRP53, JMJD6, PIK3CB, JAG2, SMAD3, ITGB2, NFAM1, FAS, TSHR, PRKCD, CBFB
GO:0045321~leukocyte activation	0.037081	H60B, TRP53, JMJD6, JAG2, SMAD3, ITGB2, NFAM1, FAS, TSHR, PRKCD, CBFB
GO:0048534~hemopoietic or lymphoid organ development	0.039477	TRP53, JAG2, TTC7, NFAM1, SIX4, CBFB, BCL2L11, CRKL, JMJD6, JAK3, FAS, TSHR, CHUK
GO:0033077~T cell differentiation in the thymus	0.04278	TRP53, JMJD6, JAG2, FAS

Anexo N - Função relacionada à regulação do ciclo celular com os genes menos expressos exclusivamente após tratamento com a combinação de p19Arf + IFN β . Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.7.

Term	PValue	Genes
cell division	2.34E-09	CKS1B, FZR1, ANLN, AURKB, BUB1, CCNA2, ASPM, CDCA3, CDK1, KIF11, SGOL2, ANAPC4, NUF2, NUSAP1, CDK6, RACGAP1, CDC26, UBE2C, CDK5, SEPT10, TACC1, CDK2, SEPT11, RAB11FIP4, CCNB1, CCNB2, MAD2L1, PLK1, SETD8, NEK6, SEPT9
GO:0007049~cell cycle	1.83E-08	ADCY3, RAD51C, E2F4, PKMYT1, AURKB, MEN1, SIN3A, CUL7, TUBB5, H2AFX, CCNA2, ASPM, CDCA3, ARL2, CDK1, KIF11, PDPN, SGOL2, ANAPC4, TPX2, NUSAP1, CDK6, UBE2C, CDK5, CDK2, TACC1, MAD2L1, PMP22, NEK6, SEPT9, CKS1B, FZR1, ANLN, SMARCB1, BCL2, BUB1, LFNG, CSRP2BP, MKI67, PCNT, NUF2, RACGAP1, CDC26, SEPT10, SEPT11, CCNB1, CCNB2, MAPK12, PLK1, SETD8, CALM2
GO:0051301~cell division	5.65E-08	CKS1B, FZR1, ANLN, AURKB, BUB1, CCNA2, TOP2A, ASPM, CDCA3, CDK1, KIF11, SGOL2, ANAPC4, NUF2, NUSAP1, CDK6, RACGAP1, CDC26, UBE2C, CDK5, SEPT10, TACC1, CDK2, SEPT11, CCNB1, CCNB2, MAD2L1, PLK1, SETD8, NEK6, SEPT9
GO:0022402~cell cycle process	1.29E-07	ADCY3, RAD51C, FZR1, E2F4, ANLN, AURKB, MEN1, SIN3A, BCL2, BUB1, TUBB5, H2AFX, CCNA2, LFNG, ASPM, CDCA3, CDK1, CSRP2BP, KIF11, MKI67, SGOL2, PCNT, ANAPC4, NUF2, TPX2, NUSAP1, RACGAP1, CDC26, UBE2C, CDK2, CCNB1, CCNB2, MAD2L1, PLK1, SETD8, PMP22, NEK6
cell cycle	1.32E-07	CKS1B, FZR1, E2F4, PKMYT1, ANLN, AURKB, SMARCB1, BUB1, H2AFX, CCNA2, ASPM, CDCA3, ARL2, CDK1, KIF11, SGOL2, ANAPC4, NUF2, NUSAP1, CDK6, RACGAP1, CDC26, UBE2C, CDK5, SEPT10, TACC1, CDK2, SEPT11, CCNB1, RAB11FIP4, MAD2L1, CCNB2, MAPK12, PLK1, SETD8, LIN54, PMP22, NEK6, SEPT9
GO:0022403~cell cycle phase	1.58E-07	ADCY3, RAD51C, FZR1, E2F4, ANLN, AURKB, SIN3A, BCL2, BUB1, TUBB5, H2AFX, CCNA2, LFNG, ASPM, CDCA3, CDK1, KIF11, MKI67, SGOL2, PCNT, ANAPC4, NUF2, TPX2, NUSAP1, CDC26, UBE2C, CDK2, CCNB1, CCNB2, MAD2L1, PLK1, SETD8, NEK6
mmu04914:Progesterone-mediated oocyte maturation	1.94E-07	ADCY3, CDK1, FZR1, ANAPC4, PKMYT1, CDC26, CDK2, PRKX, CCNB1, AKT1, IGF1R, MAD2L1, CCNB2, MAPK12, PLK1, BUB1, CCNA2
GO:0000279~M phase	2.14E-07	ADCY3, RAD51C, FZR1, ANLN, AURKB, BUB1, TUBB5, H2AFX, LFNG, CCNA2, ASPM, CDCA3, CDK1, KIF11, MKI67, SGOL2, PCNT, ANAPC4, NUF2, TPX2, NUSAP1, CDC26, UBE2C, CDK2, CCNB1, CCNB2, MAD2L1, PLK1, SETD8, NEK6
mitosis	2.34E-06	CDK1, FZR1, KIF11, ANAPC4, NUF2, NUSAP1, ANLN, AURKB, CDC26, UBE2C, CDK2, CCNB1, MAD2L1, CCNB2, PLK1, BUB1, SETD8, CCNA2, ASPM, NEK6, CDCA3
GO:0048285~organelle fission	5.87E-06	CDK1, FZR1, KIF11, ANAPC4, NUF2, NUSAP1, ANLN, AURKB, CDC26, UBE2C, CDK2, CCNB1, PEX11B, MAD2L1,

		CCNB2, PLK1, BUB1, SETD8, CCNA2, NEK6, ASPM, CDCA3
mmu04110:Cell cycle	7.27E-06	CDK1, FZR1, E2F4, ANAPC4, PKMYT1, CDK6, CDC26, YWHAE, CDK2, TGFB1, CCNB1, MAD2L1, CCNB2, PLK1, BUB1, ABL1, MYC, CCNA2
GO:0000280~nuclear division	1.18E-05	CDK1, FZR1, KIF11, ANAPC4, NUF2, NUSAP1, ANLN, AURKB, CDC26, UBE2C, CDK2, CCNB1, MAD2L1, CCNB2, PLK1, BUB1, SETD8, CCNA2, ASPM, NEK6, CDCA3
GO:0007067~mitosis	1.18E-05	CDK1, FZR1, KIF11, ANAPC4, NUF2, NUSAP1, ANLN, AURKB, CDC26, UBE2C, CDK2, CCNB1, MAD2L1, CCNB2, PLK1, BUB1, SETD8, CCNA2, ASPM, NEK6, CDCA3
GO:0000087~M phase of mitotic cell cycle	1.61E-05	CDK1, FZR1, KIF11, ANAPC4, NUF2, NUSAP1, ANLN, AURKB, CDC26, UBE2C, CDK2, CCNB1, MAD2L1, CCNB2, PLK1, BUB1, SETD8, CCNA2, ASPM, NEK6, CDCA3
GO:0000278~mitotic cell cycle	1.65E-05	CDK1, FZR1, KIF11, E2F4, ANAPC4, NUF2, NUSAP1, ANLN, AURKB, CDC26, UBE2C, CDK2, CCNB1, SIN3A, MAD2L1, CCNB2, PLK1, BCL2, BUB1, SETD8, CCNA2, NEK6, ASPM, CDCA3
mmu04114:Oocyte meiosis	3.00E-05	ADCY3, CDK1, ANAPC4, PKMYT1, CDC26, YWHAE, CDK2, PRKX, CCNB1, IGF1R, MAD2L1, CCNB2, MAPK12, PLK1, BUB1, CALM2
cyclin	0.021348	CCNB1, CCNB2, CDK6, CDK5, CCNA2, CDK2
PIRSF001771:cyclin, A/B/D/E types	0.035021	CCNB1, CCNB2, CCNA2
IPR014400:Cyclin, A/B/D/E	0.040191	CCNB1, CCNB2, CCNA2
PIRSF001771:Cyclin_A_B_D_E	0.042816	CCNB1, CCNB2, CCNA2
cell cycle control	0.956938	CCNB1, CDK1, MKI67, CDK6, CDK5, CCNA2
cyclin	0.956938	CCNB1, CCNB2, CDK6, CDK5, CCNA2, CDK2
PIRSF000564:kinase-related transforming protein	0.797448	CDK1, CDK6, CDK5, PRKX, CDK2

Anexo O - Função relacionada à regulação de processos metabólicos enriquecida com os genes menos expressos exclusivamente após tratamento com a combinação de p19Arf + IFN β . Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.7.

Term	PValue	Genes
GO:0019318~hexose metabolic process	0.002276	ALDH5A1, PFKFB3, G6PC3, CPT1A, AKT1, GALK1, H6PD, ENO3, PDHA1, MYC, POFUT1, FABP5, PYGB, MDH1, B3GALT1
GO:0005996~monosaccharide metabolic process	0.002481	ALDH5A1, PFKFB3, NAGK, G6PC3, CPT1A, AKT1, GALK1, H6PD, ENO3, PDHA1, MYC, POFUT1, FABP5, PYGB, MDH1, B3GALT1
GO:0006006~glucose metabolic process	0.023564	AKT1, H6PD, ALDH5A1, ENO3, PDHA1, MYC, G6PC3, FABP5, CPT1A, MDH1, PYGB
GO:0006687~glycosphingolipid metabolic process	0.02742	ST6GALNAC6, GM2A, ALDH5A1, CLN6
GO:0001573~ganglioside metabolic process	0.037597	ST6GALNAC6, GM2A, CLN6
GO:0006664~glycolipid metabolic process	0.040346	ST6GALNAC6, GM2A, ALDH5A1, CLN6
GO:0006793~phosphorus metabolic process	0.002651	ERBB2, PASK, 4930444A02RIK, PKMYT1, ABI2, AURKB, ATP5G1, OCRL, EPHB4, PRKX, TGFB1, AKT1, GPD1L, DUSP18, GALK1, IGF1R, UQCR11, FXN, BCL2, PTPLA, BUB1, EEF2K, ATP5O, MTMR9, AGK, ATP5K, MTMR4, TES, IRAK1, CDK1, PTPN9, TRIM28, CDK6, CDK5, CDK2, CCNB1, DUSP4, EYA1, RPS6KA4, MAPK12, PLK1, ATP6V0A1, TNK2, ATP5A1, ABL1, NEK6, DUSP6
GO:0006796~phosphate metabolic process	0.002651	ERBB2, PASK, 4930444A02RIK, PKMYT1, ABI2, AURKB, ATP5G1, OCRL, EPHB4, PRKX, TGFB1, AKT1, GPD1L, DUSP18, GALK1, IGF1R, UQCR11, FXN, BCL2, PTPLA, BUB1, EEF2K, ATP5O, MTMR9, AGK, ATP5K, MTMR4, TES, IRAK1, CDK1, PTPN9, TRIM28, CDK6, CDK5, CDK2, CCNB1, DUSP4, EYA1, RPS6KA4, MAPK12, PLK1, ATP6V0A1, TNK2, ATP5A1, ABL1, NEK6, DUSP6
GO:0016310~phosphorylation	0.017347	ERBB2, PASK, 4930444A02RIK, PKMYT1, ABI2, ATP5G1, AURKB, EPHB4, TGFB1, PRKX, AKT1, IGF1R, GALK1, UQCR11, FXN, BCL2, EEF2K, BUB1, ATP5O, AGK, ATP5K, TES, IRAK1, CDK1, TRIM28, CDK6, CDK5, CDK2, CCNB1, RPS6KA4, MAPK12, PLK1, ATP6V0A1, ATP5A1, TNK2, ABL1, NEK6
kinase	0.031645	COASY, PFKFB3, FASTK, ERBB2, PASK, PIP5K1C, PKMYT1, AURKB, NAGK, EPHB4, PRKX, TK1, AKT1, IGF1R, GALK1, EEF2K, BUB1, PAPSS1, AGK, IRAK1, CDK1, PDXK, SPHK1, CDK6, CDK5, CDK2, RPS6KA4, MAPK12, PLK1, AKAP7, TNK2, ABL1, GUK1, NEK6

Anexo P - Função relacionada à organização da cromatina enriquecida com os genes menos expressos exclusivamente após tratamento com a combinação de p19Arf + IFN β . Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.7.

Term	PValue	Genes
GO:0051276~chromosome organization	1.00E-05	RAD51C, CBX3, CTCF, TRRAP, CBX1, MEN1, SMARCB1, SMARCD1, PBRM1, H2AFX, ASF1B, TOP2A, CHD4, CSRP2BP, SATB2, EHMT1, L3MBTL2, HIST1H2BE, HIST1H1B, SGOL2, NUSAP1, WHSC1, RBBP7, HDAC3, HIST2H2BB, EYA1, MAD2L1, SMARCC1, PHF15, SETD7, SETD8, NCAPH2, RBM14, HDAC7
GO:0016568~chromatin modification	2.62E-05	CSRP2BP, SATB2, EHMT1, L3MBTL2, CBX3, CTCF, WHSC1, TRRAP, RBBP7, MEN1, HDAC3, EYA1, SMARCB1, SMARCC1, SMARCD1, PHF15, PBRM1, SETD7, SETD8, ASF1B, RBM14, HDAC7, CHD4
GO:0006325~chromatin organization	3.12E-05	CBX3, CTCF, TRRAP, CBX1, MEN1, SMARCB1, SMARCD1, PBRM1, H2AFX, ASF1B, CHD4, CSRP2BP, SATB2, EHMT1, L3MBTL2, HIST1H2BE, HIST1H1B, WHSC1, RBBP7, HDAC3, EYA1, HIST2H2BB, SMARCC1, PHF15, SETD7, SETD8, RBM14, HDAC7
chromatin regulator	7.94E-05	SATB2, L3MBTL2, CBX3, WHSC1, CTCF, TRRAP, RBBP7, DPY30, HDAC3, EYA1, SMARCB1, SMARCC1, SMARCD1, PBRM1, SETD7, SETD8, ASF1B, HDAC7, CHD4
GO:0016568~chromatin modification	2.62E-05	CSRP2BP, SATB2, EHMT1, L3MBTL2, CBX3, CTCF, WHSC1, TRRAP, RBBP7, MEN1, HDAC3, EYA1, SMARCB1, SMARCC1, SMARCD1, PHF15, PBRM1, SETD7, SETD8, ASF1B, RBM14, HDAC7, CHD4
GO:0016570~histone modification	0.040722	MEN1, CSRP2BP, HDAC3, EYA1, EHMT1, PHF15, TRRAP, RBM14
GO:0016569~covalent chromatin modification	0.049462	MEN1, CSRP2BP, HDAC3, EYA1, EHMT1, PHF15, TRRAP, RBM14

Anexo Q - Função relacionada à respiração celular enriquecida com os genes menos expressos exclusivamente após tratamento com a combinação de p19Arf + IFN β . Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.7.

Term	PValue	Genes
GO:0045333~cellular respiration	2.97E-05	SLC25A12, UQCR11, IDH3G, FXN, ACO1, ALDH5A1, SDHC, SDHD, 2610507B11RIK, SOD2, MDH1
GO:0006091~generation of precursor metabolites and energy	4.03E-05	NDUFA4, ACO1, ALDH5A1, ATP5G1, CYB5, SOD2, SLC25A12, AKT1, NDUFS7, IDH3G, UQCR11, FXN, SDHC, SDHD, ATP6V0A1, 2610507B11RIK, ENO3, ATP5O, PDHA1, ATP5A1, STEAP2, ATP5K, PYGB, MDH1
GO:0015980~energy derivation by oxidation of organic compounds	1.31E-04	ALDH5A1, ACO1, SOD2, AKT1, SLC25A12, IDH3G, UQCR11, FXN, SDHC, SDHD, 2610507B11RIK, PYGB, MDH1
GO:0009060~aerobic respiration	2.86E-04	IDH3G, FXN, ACO1, SDHC, SDHD, 2610507B11RIK, MDH1
GO:0009109~coenzyme catabolic process	4.33E-04	IDH3G, NCF2, ACO1, SDHC, SDHD, 2610507B11RIK, MDH1
GO:0006084~acetyl-CoA metabolic process	6.32E-04	IDH3G, ACO1, SDHC, SDHD, 2610507B11RIK, ACLY, MDH1
GO:0051187~cofactor catabolic process	7.55E-04	IDH3G, NCF2, ACO1, SDHC, SDHD, 2610507B11RIK, MDH1
GO:0006099~tricarboxylic acid cycle	0.00104	IDH3G, ACO1, SDHC, SDHD, 2610507B11RIK, MDH1
GO:0046356~acetyl-CoA catabolic process	0.001276	IDH3G, ACO1, SDHC, SDHD, 2610507B11RIK, MDH1
mmu00020:Citrate cycle (TCA cycle)	0.001279	IDH3G, ACO1, SDHC, SDHD, ACLY, PDHA1, MDH1
tricarboxylic acid cycle	0.003185	IDH3G, ACO1, SDHC, SDHD, MDH1
GO:0006732~coenzyme metabolic process	0.003815	COASY, NCF2, ALDH5A1, ACO1, ACLY, MTHFD1L, SOD2, IDH3G, H6PD, SDHC, SDHD, 2610507B11RIK, MDH1
GO:0051186~cofactor metabolic process	0.004067	COASY, NCF2, ACO1, ALDH5A1, ACLY, MTHFD1L, SOD2, SLC11A2, IDH3G, FXN, H6PD, SDHC, SDHD, 2610507B11RIK, MDH1
GO:0022900~electron transport chain	0.016105	NDUFA4, SLC25A12, NDUFS7, UQCR11, ALDH5A1, SDHC, SDHD, STEAP2, CYB5, SOD2

Anexo R - Função relacionada à morfogênese celular enriquecida com os genes menos expressos exclusivamente após tratamento com a combinação de p19Arf + IFN β . Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.7.

Term	PValue	Genes
GO:0048858~cell projection morphogenesis	0.024279	E2F4, ERBB2, PCNT, VANGL2, ALMS1, PIP5K1C, NTNG2, EVL, L1CAM, CDK5, VASP, SLC11A2, BCL2, ETV1
GO:0032990~cell part morphogenesis	0.034421	E2F4, ERBB2, PCNT, VANGL2, ALMS1, PIP5K1C, NTNG2, EVL, L1CAM, CDK5, VASP, SLC11A2, BCL2, ETV1
GO:0000902~cell morphogenesis	0.042141	E2F4, PDPN, PCNT, ERBB2, VANGL2, TRIM28, ALMS1, PIP5K1C, NTNG2, EVL, L1CAM, ECT2, CDK5, VASP, TGFB1, SLC11A2, BCL2, ETV1
GO:0030027~lamellipodium	0.002241	AKT1, ARHGAP31, ARPC3, PDPN, ABI2, EVL, CDK5, VASP, PARVA
GO:0031252~cell leading edge	0.003028	AKT1, ARHGAP31, TLN1, ARPC3, PDPN, ABI2, EVL, CDK5, FBXO10, VASP, LCP1, PARVA
cell projection	0.014522	TLN1, MYO1C, PDPN, CLSTN1, ABI2, ALMS1, EVL, CDK5, VASP, SEPT11, ARHGAP31, ARPC3, RASGRP2, LCP1
GO:0042995~cell projection	0.023363	TNFRSF21, HMGB1, TLN1, CLSTN1, ABI2, L1CAM, TGFB1, AKT1, SLC11A2, ARPC3, CRMP1, RASGRP2, MYC, PRSS12, TES, CUBN, MYO1C, PDPN, ALMS1, EVL, DPYSL2, CDC26, CDK5, VASP, SEPT11, ARHGAP31, TNK2, CACNA1C, LCP1, FBXO10, PARVA, PYGB
GO:0030175~filopodium	0.046813	PDPN, ABI2, CDK5, VASP
GO:0007010~cytoskeleton organization	0.005615	RHOJ, MTSS1, TLN1, KIF11, PCNT, NUF2, TPX2, NUSAP1, EVL, RACGAP1, DAAM2, SIRPA, VASP, TACC1, PFN1, LASP1, BCL2, EPB4.1, TUBB5, ABL1, LCP1, TES
GO:0030029~actin filament-based process	0.009216	RHOJ, MTSS1, TLN1, EVL, RACGAP1, DAAM2, SIRPA, VASP, PFN1, BCL2, EPB4.1, WIPF1, ABL1, LCP1
GO:0030036~actin cytoskeleton organization	0.013546	RHOJ, MTSS1, TLN1, EVL, RACGAP1, SIRPA, DAAM2, VASP, PFN1, BCL2, EPB4.1, ABL1, LCP1

Anexo S - Função relacionada à adesão celular enriquecida com os genes menos expressos exclusivamente após tratamento com a combinação de p19Arf + IFN β . Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.7.

Term	PValue	Genes
GO:0005925~focal adhesion	0.001161	ARHGAP31, TLN1, SORBS3, LASP1, PIP5K1C, EVL, VASP, PARVA, TES
GO:0005924~cell-substrate adherens junction	0.001818	ARHGAP31, TLN1, SORBS3, LASP1, PIP5K1C, EVL, VASP, PARVA, TES
GO:0005912~adherens junction	0.001957	ARHGAP31, TLN1, SORBS3, LASP1, ABI2, LMO7, PIP5K1C, SPNA2, EVL, VASP, PARVA, TES
GO:0030055~cell-substrate junction	0.003017	ARHGAP31, TLN1, SORBS3, LASP1, PIP5K1C, EVL, VASP, PARVA, TES
GO:0070161~anchoring junction	0.006181	ARHGAP31, TLN1, SORBS3, LASP1, ABI2, LMO7, PIP5K1C, SPNA2, EVL, VASP, PARVA, TES
GO:0016323~basolateral plasma membrane	0.038022	ARHGAP31, TLN1, SORBS3, LASP1, PIP5K1C, PPT2, EVL, VASP, AGPAT1, PARVA, TES
GO:0030054~cell junction	0.044859	TLN1, ACHE, CLSTN1, ABI2, PIP5K1C, LMO7, AMOTL1, SYNGR1, RABAC1, SORBS3, HMCN1, RASGRP2, SCAMP5, TES, GLRB, EVL, SSPN, SEPT11, VASP, GJB2, ARHGAP31, LASP1, SPNA2, TJP2, LCP1, PARVA

Anexo T - Manuscrito submetido à revista Human Gene Therapy

Simultaneous gene transfer of p19Arf and interferon-beta by a novel RGD-modified adenoviral vector induces immunogenic cell death and a strong bystander effect in a mouse model of melanoma

Aline H. Ribeiro¹, Ruan F. V. Medrano¹, Daniela B. Zanatta¹, Christian A. Merkel²,
Eugenia Costanzi-Strauss³ and Bryan E. Strauss^{1,4}.

1-Viral Vector Laboratory, Center for Translational Investigation in Oncology, Cancer Institute of Sao Paulo/LIM 24, University of Sao Paulo School of Medicine, Brazil; 2-Centro de Bioterismo (Animal Care Center), University of Sao Paulo School of Medicine; 3-Gene Therapy Laboratory, Biomedical Sciences Institute, University of Sao Paulo, Brazil.

4-Corresponding Author:
Viral Vector Laboratory
Center for Translational Investigation in Oncology (CTO)
Cancer Institute of Sao Paulo (ICESP)
Av. Dr. Arnaldo, 251, 8th floor
Sao Paulo, SP, Brazil
Postal code 01246-000
55 11 3893-3554
bstrauss@usp.br
bryan.strauss@hc.fm.usp.br

Running title: Improved melanoma gene therapy with AdRGD-PG

Sources of support: Sao Paulo Research Foundation grants (Strauss, B.E) 13/25167-5, 11/50911-4; fellowships (Medrano, R.F.V) 13/09474-5, (Ribeiro, A.H) 08/55963-0, 11/10656-5.

Key words: p53, CDKN2a, interferon, gene therapy, apoptosis, melanoma

Abstract:

Late stage melanoma continues to be quite difficult to treat and new therapeutic approaches are needed. Since these tumors often retain wild-type p53, we propose that the treatment strategy may include mechanisms to recruit and activate cellular p53 protein. Here we describe a novel adenoviral vector that offers both p53-regulated transgene expression as well as the RGD modification in the fiber protein. This vector platform, AdRGD-PG, was used to transfer the p19Arf and interferon- β (IFN β) cDNAs, either alone or in combination, to the mouse melanoma cell line, B16, *in vitro* or as *in situ* gene therapy. We observed that gene transfer conferred reduced proliferation and increased cell death. Combined, but not individual, gene transfer of p19Arf and IFN β resulted in >50% hypodiploid cells, associated with markers of immunogenic cell death, where as individual gene transfer resulted in, at most, 34% hypodiploid cells. We also show the importance of the use of adenoviral vectors since the levels of cell death induced by the p19Arf/IFN β combination were higher when these factors were transferred by AdRGD-PG compared to approaches using pharmacological mimetics. Strikingly, p19Arf gene transfer sensitized cells to the bystander effect initiated by IFN β , killing as much as 68% of cells even when only 10% of these were expressing IFN β . This effect was also observed *in vivo*, where 45% of tumor cells were transduced but more than 70% of cells succumbed to the effect of secreted IFN β . These data show that the combination of p19Arf and IFN β gene transfer mediated by a p53-responsive adenoviral vector is an effective means of killing melanoma by either direct transduction or via a strong bystander effect.

Introduction:

Malignant melanoma is a type of cancer with high death rates due, in part, to the lack of efficient treatments once metastases have formed.¹ However, the genetic alterations typically seen in these tumors may present targets and opportunities for therapeutic intervention.

The tumor suppressor protein p53 is found in its wild type form in 90% of melanoma cases, though other components of this pathway may be altered. Tolerance to p53wt during melanomagenesis can be achieved through the overexpression of its negative regulator HDM2, found in 56% cases,^{2,3} and loss of its functional partner on the CDKN2A locus (where p14ARF resides), which occurs in some 50% of primary melanomas.⁴ As p53wt is maintained at such a high frequency in melanoma, we and others propose that it may be recruited to participate in the therapeutic approach.⁵⁻⁷

In initial works from our group, we introduced the notion of using p53 to control transgene expression in viral vectors used for gene transfer.⁸⁻¹⁰ Indeed, we showed that the use of p53 to promote transgene expression was advantageous when using retroviral, adenoviral and adenoassociated virus vectors.¹⁰⁻¹² However, B16 melanoma cells (p53wt) were shown to be resistant to the effects of p53 gene transfer.¹¹ For this reason, we switched our attention to p19Arf (p19Arf in murines, p14ARF in humans), in order to restore the p53 pathway and promote cell death. Treatment of B16 cells with a p53-responsive retroviral vector encoding p19Arf along with Nutlin-3, a small molecule inhibitor of MDM2, resulted in activation of endogenous p53 as well as reduced proliferation and viability of B16 cells both *in vitro* and *in vivo*.¹² These studies imply that exogenous p19Arf, delivered by the p53-responsive vector, can work in conjunction with the endogenous p53 pathway, generating interplay between the vector, the transgene and cellular p53.

However, delivery of p19Arf to melanoma cells is not expected to yield an effect beyond those few transduced cells. That is to say, p19Arf working alone would have an impact only on the transduced cells, not on neighboring cells at the treatment site. Clearly, a secreted factor with cytotoxic activities would aid in the induction of a bystander effect. For this, more recently, we have chosen interferon- β (IFN β), a pleiotropic cytokine with cytostatic, anti-angiogenic, pro-apoptotic as well as immunomodulatory activities.¹³

Interestingly, several reports indicate that the p53 and interferon pathways interact. For example, Takaoka et al¹⁴ have shown that treatment of cells with recombinant type I (α or β) interferon results in the induction of p53 transcription and in the augmentation of anti-viral activities in the presence of p53. Other works have implied that p14ARF is critical for induction of apoptosis in response to type I interferon.¹⁵ Mice with over-expression of p53 show resistance to viral replication due to p53-mediated apoptosis and may involve p53-dependent enhancement of interferon signaling.^{16, 17} However, the participation of the p53 pathway in response to IFN β gene transfer has not been thoroughly examined.

Type I interferon as a treatment for melanoma has been tested as either biochemotherapy or gene therapy¹⁸ and adjuvant therapy with IFN β is standard practice in Japan where low-dose administration has been reported as beneficial for maintenance therapy.¹⁹ However, higher doses or continuous administration of IFN β were met with limited efficacy and toxicity for the treatment of disseminated melanoma.^{20, 21} Intratumor melanoma gene therapy approaches should provide high local concentrations of IFN β and avoid systemic toxicity. Indeed, gene therapy without adverse events and with signs of immune response was performed, yet this monotherapy was found to be

ineffective.²² We propose that a strategic partnership between IFN β and p19Arf would improve efficacy through increased cell death.

Using a p53-responsive adenoviral vector, called AdPG (non-replicating, serotype 5), for the transfer of p19Arf or IFN β , we have shown that the co-transduction of B16 cells with AdPGp19Arf and AdPGIFN β resulted in improved cell killing both *in vitro* and *in vivo*.²³ Interestingly, we also showed that combined, but not individual, gene transfer confers NK cell activation, T lymphocyte immune response, improved survival in a prophylactic vaccine model as well as reduced tumor progression in a therapeutic vaccine approach.²⁴ One possible mechanism behind this would be the ability of the p19Arf and IFN β combination to provoke immunogenic cell death, a process in which exposure of the reticular chaperone calreticulin, autophagy-dependent secretion of ATP and release of the nuclear protein high mobility group box 1 (HMGB1) are considered to be the principle markers.^{25, 26} Moreover, autocrine secretion of type I IFN as well as IFN-I-stimulated genes (ISGs) were recently discovered to be involved in this process.²⁷ Since p19Arf was employed to promote cell death and IFN β to stimulate an immune response, it would be of great interest to pursue the induction of immunogenic cell death induced by our gene transfer approach.

Though we have some evidence that the combined transfer of p19Arf and IFN β may be of interest, our previous studies were hampered by several technological shortcomings and did not explore critical aspects of the cellular response to this treatment. For example, B16 cells are not permissive to transduction with Ad5^{28, 29} and were modified to stably express the murine coxsackie-adenovirus receptor (mCAR) in order to support transduction with the Ad5 vector. In this scenario, the induction of cell death by the combined gene transfer approach was slow, requiring 96 hours of incubation, response to *in situ* gene therapy lasted only 25 days and co-transduction was

performed instead of using a bicistronic vector for the simultaneous transfer of the two factors.^{23, 24} In addition, the desired bystander effect provided by IFN β was not explored.

We show here for the first time the use of a novel adenoviral vector that carries both a p53-responsive promoter for the control of transgene expression as well as an RGD-modified knob protein for increased viral tropism at the transductional level. This AdRGD-PG vector was used for the simultaneous, bicistronic transfer of p19Arf and IFN β , resulting in enhancement of cell death and, remarkably, an increase in the release of immunogenic cell death markers as compared to the transfer of either factor alone. We also demonstrate that gene transfer of p19Arf or IFN β can be successfully substituted by pharmacological approaches, but transduction with an adenoviral vector is needed for the induction of cell death. In addition, the bystander effect mediated by the gene transfer of IFN β was augmented in the presence of p19Arf and demonstrated *in vivo*, in tumor bearing mice. The work presented here shows the importance of the vector platform as well as the gene combination for the effective killing of melanoma cells.

Materials and methods:

Cell culture and lines

The adenovirus-transformed, human embryonic kidney cell line 293A (HEK293A, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was maintained in DMEM (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% bovine calf serum (BCS, HyClone, Logan, UT, USA), 100 µg/ml gentamycin, 50 µg/ml ampicillin, and 2.5 µg/ml fungizone, at 37 °C, in a humidified atmosphere of 5% CO₂. The mouse melanoma cell line B16F10 (B16, ATCC CRL-6475) was cultured as above, except using Roswell Park Memorial Institute medium (Invitrogen, Grand Island, NY, USA). B16mCAR cells have been described previously.²³ Briefly, B16 cells were transduced with a retrovirus encoding murine CAR (kindly provided by James DeGregori, University of Colorado School of Medicine, Aurora, CO, USA) followed by selection with G418.³⁰ The pGreenFire1-ISRE reporter construct, a lentiviral vector which expresses both GFP and luciferase in response to type I IFN signaling, was obtained commercially (System Biosciences, Mountain View, CA, USA) and used to transduce B16 cells. Based on GFP expression, these cells were sorted (2 rounds) and the resulting cell line is referred to as B16ISRE-GFP-Luc.

Construction of adenoviral vectors

Our group has a set of adenoviral vectors constructed following Gateway® technology (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), as described previously.²³ In this system, we constructed desired expression cassettes in an entry vector (denominated pENTR™) and, by site directed recombination, transfer these cassettes to adenoviral vectors (denominated pAd/PL-DEST™). We kindly received from Dr. Hiroyuki Mizuguchi (Osaka University, Japan) a modified adenoviral vector containing the RGD motif

(between residues threonine-546 and proline-547 of the fiber protein) that follows Adeno-XTM technology (Clontech, Mountain View, CA, USA).²⁹ In order to render this vector compatible with the site directed recombination strategy and our existing pENTR vectors, extensive modifications were made. First we removed the SV40, polyA and CMV sequences from pShuttle2 (Clontech, Mountain View, CA, USA) and then we inserted, between *Not* I sites in this vector, the Gateway® sequence that was amplified from pAd/PL-DESTTM. Then, the Gateway® sequence was removed from the new pShuttle vector and inserted in AdRGD vector, by *PI-Sce* I and *I-Ceu* I digestions. Once this was made, we could transfer, by site directed recombination between pENTRTM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and the new AdRGD-PG-DEST vector, our expression cassettes containing the PG promoter, transgene of interest and a polyA sequence. The set of AdRGD-PG vectors constructed includes three monocistronic vectors, containing the eGFP or the p19Arf or the murine IFN β genes, and one bicistronic vector, which contains both p19Arf and IFN β genes separated by the IRES sequence described in Ghattas et al.³¹ All vectors express the transgenes under control of a p53-responsive promoter, called PG, previously described in Bajgelman and Strauss.⁹ Cloning details are available upon request.

Adenovirus production

HEK293A cells were cultivated 7.5×10^5 cells/well in 6 well dishes and transfected as described by calcium phosphate precipitation with 5 μ g of the adenoviral vector, previously linearized with *Pac* I enzyme digestion. The cells were collected 5 to 7 days post-transfection, lysed with 3 freeze-thaw cycles and centrifuged for 5 minutes at 4000 rpm. Then, the virus-containing supernatant was collected, aliquoted and stored at -80 °C. For amplification, we used 250 μ l of the supernatant previously collected to

transduce 5×10^5 HEK293A cells in a 3.5 cm dish and, 5 to 7 days after transduction, the virus was collected by the same lysis method described above. This procedure was repeated and scaled up to a 10 cm dish. We then used about 5 to 15 μ l of the supernatant collected from the final amplification step to transduce 25 15-cm dishes of HEK293A cells plated at 80% confluence. After observation of the cytopathic effect, cells were collected and lysed prior to purification of the adenoviral vectors performed by iodixanol gradient separation followed by desalting.³² The biological titer was determined using the Adeno-X Rapid titration kit (Clontech, Mountain View, CA, USA).

X-Gal staining

B16 or B16mCAR cells were plated 1×10^5 cells/well of a 6-well dish, transduced 24 hours later with equal amounts of AdRGD-CMV-lacZ (provided by Dr. Hiroyuki Mizuguchi) or Ad-CMV-lacZ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and fixed with 2% paraformaldehyde/0.2% glutaraldehyde 48 hours after plating. For X-Gal staining, cells were first washed with 0.1 M phosphate buffer (pH 7.3) supplemented with 2 mM MgCl_2 and then immersed in X-Gal staining buffer (0.1 M phosphate buffer, pH 7.3, supplemented with 2 mM MgCl_2 , 5 mM potassium ferrocyanide, 5 mM potassium ferricyanide and 1 mg/ml of X-Gal). Cells were incubated in this buffer at 37 °C overnight.

Flow cytometric detection of eGFP

Cells were plated 1×10^5 cells/6 cm dish, transduced in the next day with a MOI of 50 of AdRGD-PG-eGFP and, 24 hours after the transductions, treated with doxorubicin (100 ng/ml) for 16 hours before harvesting for flow cytometric assessment

of eGFP expression (FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). The median intensity of eGFP expression was determined by the FACS software CellQuest software (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Immunofluorescence detection of p19Arf

Cells were plated on 13 mm round glass coverslips, 5×10^4 cells/well, in 24 well dishes, transduced 24 hours later with a MOI of 25 of adenoviral vectors and fixed 48 hours later using cold methanol. Then, cells were blocked with bovine serum albumin, probed with a polyclonal antibody for p19Arf (AB-1, Cal-Biochem, San Diego, CA, USA) followed by an Alexa-488 labeled anti-rabbit secondary antibody (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Nuclear staining was performed with Hoechst 33258, 20 $\mu\text{g/ml}$ (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Cells were visualized by confocal microscopy at 63x amplification.

Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IFN β

Supernatant was collected from the same cells used in the immunofluorescence assay, above. Detection of IFN β was made following procedures of PBL BiomedicalTm manual and absorbance (450nm) was determined with VictorTm plate reader (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA).

Growth curve

Cells were plated, 1×10^5 cells/6 cm dish, and transduction was initiated the following day with equal quantities and concentrations of the indicated viruses (MOI of 50). Twenty-four hours post-transduction, the cells were trypsinized, counted and replated, 2×10^4 cells of each transduction were plated in each of the wells in a 12-well

dish with complete medium. Two wells per day were trypsinized and viable cells were counted manually.

Cell viability assay

Cells were transduced as described for the growth curve. For the MTT assay, cells were replated in 96-well dishes with 1×10^4 cells from each transduction in quadruplicate wells. Cells were incubated for 24, 48 and 72 hours before determination of cell viability. Plates were incubated with 25 μ l of MTT solution (5 mg/ml in 1x PBS), 37 °C during 4 hours. The dish was then removed and the precipitate solubilized by the addition of 100 μ l lysis buffer (20% SDS in 50% DMF/2% acetic acid, pH adjusted to 4.7) before analysis using VictorTm plate reader (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA) at 590 nm.

Flow cytometric assessment of cell cycle

Cells were plated 1×10^5 cells/6 cm dish, transduced in the next day with a MOI of 50 of the virus and collected at different time points for cytometric analysis of cell cycle (FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) as revealed by propidium iodide staining as described previously.²³ The cell cycle profile was determined by the FACS software CellQuest software (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Flow cytometric analysis of calreticulin (CRT) exposure

Cells were plated 1×10^5 cells/6 cm dish, transduced in the next day with a MOI of 500 of the virus and collected after 72 hours for immunostaining with a CRT-specific antibody (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA). After, cells were washed with PBS and stained with Alexa488-conjugated anti-rabbit secondary antibody (Thermo Fisher,

Rockford, USA) for analysis by flow cytometry (FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Measurement of released ATP by cells

Cells were plated 1×10^5 cells/6 cm dish, transduced the next day with a MOI of 500 of the virus and supernatant was collected 72 hours after for ATP measurement. All cells (adherent and in supernatant) were collected in order to determine total protein concentration by Bradford assay with BSA Standard. ATP concentration was measured by ENLITEN[®] ATP Assay System (Promega, Madison, WI, USA) and normalized with protein concentration of the sample. Bioluminescence Detection was made with microplate reader VictorTm (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA).

Measurement of HMGB1 release

Cells were plated 1×10^5 cells/6 cm dish, transduced in the next day with a MOI of 500 of the virus and supernatant was collected 72 hours after for HMGB1 measurement as described by HMGB1 ELISA kit (IBL International GMBH, Hamburg, Germany). All cells (adherent and in supernatant) were collected in order to determine total protein concentration by Bradford assay with BSA Standard and HMGB1 concentration was normalized with protein concentration of the sample.

Treatment with Nutlin-3, recombinant IFN β and Poly (I:C)

Cells were plated 1×10^5 cells/6 cm dish, transduced the next day with a MOI of 500 of the virus and/or treated with Nutlin-3 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), recombinant IFN β (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and/or Poly (I:C) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). For treatment with Poly (I:C), cells were transfected

using Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Cells were collected 72 hours after transduction for cytometric analysis of cell cycle alterations. In parallel, supernatant of cells transfected with Poly (I:C) was collected for detection of IFN β by ELISA, as described above.

Treatment of B16 tumor using the adenoviral vectors in a mouse melanoma model

C57BL/6 mice (7 week old, female) were obtained from the Centro de Bioterismo, FMUSP and were maintained in SPF conditions, with food and water *ad libidum*. One million B16ISRE-GFP-Luc cells were inoculated in the left flank of C57BL/6 mice and, after establishment of the tumor (10 days), mice were treated with 3 intratumoral injections of 5×10^8 infectious units (i.u.) of AdRGD-PG-eGFP or AdRGD-PG-IFN β vectors, in a volume of 25 μ l, every two days. One day after the last injection, mice were euthanized and tumors were collected for dissociation with RPMI containing 35 μ g/ml of liberase (Roche, Mannheim, Germany) and fixed with PFA 4% for cytometric analysis of GFP expression, as described above, or lysed for analysis of luciferase expression, measured with Dual-Glo $^{\circledR}$ Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI, USA) following the manufacturer's instructions and using microplate reader Victor $^{\text{TM}}$ (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA).

In another experiment, 1×10^6 B16 cells (parental, non-modified) were inoculated in the left flank of C57BL/6 mice and, after establishment of the tumor (10 days), mice were treated with 3 intratumoral injections of 5×10^8 i.u. of AdRGD vectors in a volume of 25 μ l, every two days. Tumor size was determined by measurement with a digital caliper.

All procedures and conditions were approved in accordance to the guidelines of animal care and use by the Scientific and Ethics Committee of the Cancer Institute of Sao Paulo, University of Sao Paulo School of Medicine.

Analysis of IFN β bystander effect

In the co-culture experiment, B16 cells were transduced as described for the growth curve and replated in 6 cm dishes with 1×10^5 cells total. For the mixtures, we combined in the same dish 1×10^4 cells transduced with one virus plus 9×10^4 cells transduced with a different virus, achieving a proportion of 1:9 of the mixture. For controls, we plated 1×10^5 cells of each transductions made previously. Cells were collected 72 hours after the transductions for cytometric analysis of cell cycle.

In a similar experiment, we transduced B16ISRE-GFP-Luc cells with AdRGD vectors and mixture them as described above. In this experiment, cells were collected and fixed in 4% PFA 72 hours after the transduction and GFP expression was analyzed by flow cytometry (FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). The median intensity of eGFP expression was determined by the FACS software CellQuest software (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Statistical Analysis

The GraphPad Prism 5 software (La Jolla, CA, USA) was used for statistical analyses. All comparisons were conducted through nonparametric statistical tests using one-way analysis of variance, followed by Tukey's Multiple Comparison post-test; two-way analysis of variance, followed by Bonferroni post-test; t-test, followed by Mann Whitney post-test; or log-rank Mantel-Cox test.

Results:

The AdRGD-PG platform efficiently transduces cells lacking the coxsackie-adenovirus receptor (CAR)

First, we confirmed that an RGD-modified adenovirus was indeed more efficient for the transduction of B16 cells, as shown in **Figure S1**. The AdRGD-PG vectors were established by the introduction of the p53-responsive promoter, called PG, resulting in a vector platform where transgene expression would be controlled by p53. The set of AdRGD-PG vectors constructed includes three monocistronic vectors, containing the eGFP, p19Arf or murine IFN β cDNAs as well as a bicistronic vector containing the IRES element and both the p19Arf and IFN β genes (**Figure S2**).

We next confirmed the transduction efficiency and eGFP expression levels of AdRGD-PG-eGFP in the parental, CAR-deficient B16 cell line as well as the p53-responsive control mechanism (Figure 1). In agreement with our previous studies of the p53 responsive nature of our vectors,⁸⁻¹⁰ we observed that the level of eGFP expression was elevated upon treatment with doxorubicin. The expression of p19Arf and IFN β by the mono and bicistronic AdRGD-PG vectors was also confirmed (**Figures S3 and S4**).

Combined p19Arf and IFN β gene transfer reduces cell proliferation and viability and results in an additive increase in hypodiploid cells

In a growth curve assay, the p53-responsive AdRGD-PG vectors were tested for their ability to inhibit the proliferation of B16 cells. Treatment of B16 cells with the p19Arf or IFN β transgenes, combined or alone, did confer a marked reduction in proliferation (**Figure 2A**). To confirm that the combination of p19Arf and IFN β can reduce B16 viability, we used a standard MTT assay. Cells were plated and then

transduced with the AdRGD viruses. The next day, cells were collected, counted and replated in 96-well dishes followed by MTT staining after 24, 48 and 72 hours incubation. Consistent with the previous assays, the treatment with p19Arf or IFN β significantly reduced the viability of B16 cells (**Figure 2B**).

Next, we observed that the combined treatment with p19Arf and IFN β resulted in profoundly altered cell cycle patterns when we used either the bicistronic vector or the combination of both monocistronic vectors. For example, the treatment of B16 cells with the combination of p19Arf and IFN β resulted in the accumulation of >50% hypodiploid cells, whereas individual p19Arf or IFN β gene transfer resulted in just 26% or 34% hypodiploid cells, respectively, 60 hours post transduction (**Figure 2C**).

Mono-gene transfer altered the cell cycle, though not as drastically as the combination. For example, p19Arf reduced the number of cells in S phase (48hs) and increased hypodiploid cells by 30% at 60hs. Alone, IFN β gene transfer was not able to induce more than 35% hypodiploid cells even by 60hs (**Figure 2C and 2D**). Not only were B16 cells more susceptible to the combined treatment with p19Arf and IFN β than either treatment alone, but also the induction of cell death was much faster than observed in our previous studies which required 96 hours of incubation to fully reveal gene activity.^{23, 24} In this way, the gene combination enhances cell killing while the new set of RGD-modified vectors improves the rate at which cell death was induced.

Combined gene transfer of p19Arf and IFN β unleashes immunogenic cell death

Here we investigated the induction of immunogenic cell death markers by B16 cells in response to our gene therapy approach. Combined p19Arf and IFN β gene transfer resulted in cell surface exposure of calreticulin by 15% of cells in response to the combined gene transfer, while treatment with p19Arf or IFN β alone induces only

5% or 10% of calreticulin exposure, respectively (**Figure 3A**). The induction of immunogenic cell death is also indicated since p19Arf and IFN β resulted in the accumulation of approximately 950 pmol of ATP (normalized by protein concentration of the sample) while the individual treatments with p19Arf or IFN β yielded, respectively, 60 or 20 pmol of ATP/ μ g of protein (**Figure 3B**). Release of HMGB1 by B16 cells treated with p19Arf and IFN β combination was also verified while the individual treatments only slightly increased HMGB1 release (**Figure 3C**). These assays show that only the combined gene transfer approach significantly induces all three of the classic immunogenic cell death markers.

Gene transfer of p19Arf or IFN β can be substituted by pharmacological approaches, but transduction with an adenoviral vector is required for high level induction of cell death

We wished to better characterize the induction of cell death elicited by the simultaneous stimulation of the p19Arf and IFN β pathways, exploring the specific role of MDM2 inhibition, IFN pathway activation and use of the adenoviral vector itself. However, the use of vectors may result in transgene expression levels that are quite different from physiological conditions and thus introduce a bias in the experimental system. Therefore, we compared pharmacological approaches with gene transfer of p19Arf or IFN β .

We used recombinant IFN β (IFN-R) protein (200U or 1000U) instead of the AdRGD-PG-IFN β vector. The dose of 200U is the same present in the culture medium of B16 cells after 72h of treatment with AdRGD-PG-IFN β vector and the dose of 1000U is representative of assays described in the literature.³³ Nutlin-3, a cis-imidazoline analog which prevents interaction of p53 with MDM2³⁴, similar to the main

function of p19Arf, substituted our AdRGD-PG-p19Arf vector. As shown in **Figure 4A**, the accumulation of hypodiploid cells upon treatment with IFN-R + Nutlin-3 (20-30%) was far inferior to that seen with p19Arf and IFN β gene transfer (60-70%, **Figure 4B**). This result implies that our gene transfer approach is superior to pharmacologic treatment.

However, upon combination of Nutlin-3 with AdRGD-PG-IFN β , significant levels of cell death could be detected (**Figure 4B**). We also compared the use of Nutlin-3 combined with AdRGD-PG-p19Arf and, as expected, neither the single use of Nutlin-3 or in combination with the vector encoding p19Arf were able to induce cell death in the same extent as the p19Arf and IFN β gene transfer condition, suggesting that the critical role of p19Arf gene transfer is to inhibit p53-MDM2 interaction and that other functions of p19Arf are not essential here.

As shown in **Figure 4C**, only when IFN-R was associated with AdRGD-PG-p19Arf were significant amounts of hypodiploid cells observed. Treatment with just IFN-R is not sufficient to induce cell death in either of the concentrations tested. To confirm this result, we used the double-stranded RNA analog Poly (I:C) since B16 and other tumor cells produce IFN β in an autocrine manner when treated with toll like receptor agonists, such as LPS and Poly (I:C).^{35, 36} In **Figure 4D**, we show that transfection of Poly (I:C) into B16 cells induces about 70 pg/mL of IFN β and, even though this amount is lower than that produced after AdRGD-PG-IFN β transduction, this was enough to induce similar levels of hypodiploid cells when associated with AdRGD-PG-p19Arf (**Figure 4E**).

Up to this point, we have observed that when stimulation of the p19Arf and IFN β pathways were combined in the presence of an adenoviral vector, for example AdRGD-PG-IFN β + Nutlin-3 or IFN-R + AdRGD-PG-p19Arf, the same number of

hypodiploid cells is achieved as compared to transduction with the combination of AdRGD-PG-IFN β + AdRGD-PG-p19Arf. As indicated, the success of the pharmacologic approach required the simultaneous use of gene transfer in order to reach both targets (p53/MDM2/Arf and IFN pathways).

To confirm this observation, we used combined Poly (I:C) in addition to Nutlin-3. We observed that in this case, the number of hypodiploid cells is the same as that achieved by IFN-R + Nutlin-3, thus targeting these pathways without the use of an adenoviral vector did not significantly impact cell death (**Figure 4F**). Strikingly, when Poly (I:C) and Nutlin-3 treated cells were also transduced with the AdRGD-PG-eGFP vector, cell death was induced, in a MOI responsive manner, to a level comparable to that seen with AdRGD-PGIFN β + AdRGD-PG-p19Arf transduction, confirming that the presence of an adenoviral vector is an important component for the p19Arf and IFN β response.

Gene transfer of IFN β alone or in combination with p19Arf inhibits tumor growth and increases overall survival *in vivo*

In order to verify the effect of combined p19Arf and IFN β gene transfer on tumor growth *in vivo*, 1×10^6 B16 cells were inoculated in the left flank of C57BL/6 mice and once the tumors were established (10 days), mice were treated with 3 intratumoral injections of 5×10^8 infectious units (i.u.) of AdRGD vectors, every two days (**Figure 5A**). Combined p19Arf + IFN β or the use of IFN β alone is more effective in inhibiting tumor growth as well as increasing the overall survival of mice, compared to p19Arf alone or control groups (mock or GFP) (**Figure 5B and C**). In order to sensitize tumor cells with p19Arf, we made two injections of AdRGD-PG-p19Arf in the tumor and the third injection was made with AdRGD-PG-IFN β (p19Arf $\rightarrow$ IFN β). We

observed that just one injection of AdRGD-PG-IFN β after administration of p19Arf can inhibit tumor growth more effectively as compared to treatment with AdRGD-PG-p19Arf alone or control groups, but this benefit is lost after day 20. The opposite was also done, two injections of AdRGD-PG-IFN β followed by a single injection of AdRGD-PG-p19Arf (IFN β →p19Arf), yielding a result similar to three injections of IFN β alone or in combination with p19Arf. Though not compared directly, the *in situ* gene therapy shown here using the AdRGD-PG vectors was more effective and longer lasting than seen in our previous work using the native Ad5 fiber.²³

Exploring the bystander effect mediated by IFN β *in vitro* and *in vivo*

Since IFN β is a secreted protein and was shown to be important for *in situ* gene therapy, we hypothesize that even a small percentage of cells transduced with AdRGD-PG-IFN β could have an impact on other, non-transduced neighboring cells. Such a bystander effect is demonstrated here after transducing cells with an individual vector prior to co-culture at predetermined ratios with cells transduced with a control or p19Arf. For example, when 10% or 100% of cells were transduced with AdRGD-PG-IFN β , a similar accumulation of hypodiploid cells was observed (compare 90% GFP/10% IFN β with 100% IFN β in **Figure 6A**). In other words, the bystander effect of IFN β is nearly as strong as direct transduction. However, even though IFN β treatment is enough to inhibit tumor growth *in vivo*, p19Arf is very important to sensitize cells to IFN β effects *in vitro*. When we mixed cells transduced with the p19Arf adenoviral vector with cells transduced with the bicistronic vector in a 9:1 proportion, we produced a population of cells in which essentially all express p19Arf and just 10% express IFN β . In this case, the number of hypodiploid cells increased to 68%, while transduction with IFN β results in only around 50% of hypodiploid cells.

The cellular response to IFN β was confirmed using a stably modified B16 cell line where reporter gene expression is under control of an interferon-stimulated response element (B16ISRE-GFP-Luc). When transduced and co-cultivated as described above, we observed that transduction of 10% of cells with AdRGD-PG-IFN β was sufficient to induce reporter gene expression in more than 40% of the population, essentially the same as seen when transducing 100% of the cells with this vector (**Figure 6B**). As compared to these conditions, the induction of reporter gene activity was reduced when p19Arf-positive cells were co-cultivated with IFN β -producing cells, presumably due to cell death. No significant induction of ISRE was caused by transduction with the p19Arf adenoviral vector and transduction with GFP vector was used as control to quantify transduction efficiency of AdRGD vectors. Together, these results indicate a strong bystander effect mediated by IFN β that is further enhanced in the presence of p19Arf.

The bystander effect of IFN β would be particularly interesting *in vivo*, since we do not expect all tumor cells to be transduced upon gene therapy. B16ISRE-GFP-Luc cells were inoculated in the left flank of C57BL/6 mice and tumors were treated with 3 injections of 5×10^8 i.u. of AdRGD-PG-eGFP or AdRGD-PG-IFN β vectors, every two days. One day after the last injection, tumors were collected for analysis (**Figure 6C**). As measured by detection of GFP, the AdRGD-PG-eGFP vector transduced 45% of cells, yet the bystander effect of IFN β was observed in 70% of cells (**Figure 6D**). The luciferase activity was also measured and the same result was observed. No induction of ISRE after treatment of tumors with AdRGD-PG-eGFP (~100 a.u. of luciferase activity) and a high induction of ISRE when using AdRGD-PG-IFN β vector (~500 a.u. of luciferase activity) (**Figure 6E**). These data demonstrate that the number of cells affected by IFN β *in vivo* can be much greater than the number of cells transduced by the

adenoviral vector, thus overcoming one of the main challenges of cancer treatment mediated by a gene therapy approach.

Discussion:

Our group has developed adenoviral vectors, AdRGD-PG, where transgene expression is controlled by p53 and the RGD modification permits transduction of CAR-negative cells. AdRGD-PG vectors encoding p19Arf or IFN β (a stimulator of immune response with anti-neoplastic functions) or the combination of these in a bicistronic vector were constructed. After confirming that the combination of p19Arf and IFN β induced massive death of B16 cells, while transfer of just one of these factors alone did not cause such an extensive effect, we showed evidence of a strong bystander effect as well as a critical contribution of the adenovirus-mediated gene transfer to the cellular response. Not only does the combination of genes effectively kill B16 cells, but also promotes immunogenic cell death. By using the AdRGD-PG vectors, we have now achieved faster induction of cell death as well as a longer lasting inhibition of tumor progression while using lower MOIs as compared to our previous studies using AdPG (p53-responsive, non-RGD-modified adenoviral vectors).

The work described here includes two critical technologic advances in comparison with our previous studies. First, transgenes of interest (eGFP, p19Arf and IFN β) were inserted into an adenoviral vector that presents the RGD tripeptide in its fiber. This vector modification allows efficient transduction in a wide range of target cells without dependence on the Ad5 receptor, CAR. In addition, a bicistronic vector was constructed which contains the combination of therapeutic genes, ensuring the transfer of both factors to the target cells at the same time. Use of p19Arf, a tumor suppressor and MDM2 inhibitor, as a therapeutic gene should complement endogenous p53 activities and, as a consequence, promote expression from the AdRGD-PG vector and inhibit tumor cell proliferation. However, p19Arf gene transfer alone should have an effect only in transduced cells and, therefore, its reach would be limited. For this

reason, we describe, in addition to p19Arf, the application of IFN β , a secreted protein with antitumor functions, including inhibition of angiogenesis, induction of apoptosis and activation of immunologic response. This strategy involves several mechanistic levels related with the gene transfer process, including transduction efficiency, control over transgene expression and transgene activity. Therefore, the combination of p19Arf and IFN β is an interesting strategy to induce death in the primary tumor by a mechanism consistent with immunogenic cell death. In this context, it is becoming more accepted that cancer therapies must not only reduce the primary tumor mass, but also stimulate an immune response in order to achieve a long-term control of tumor growth.²⁷ Identification of immunogenic cell death markers triggered by induction of ARF and IFN β pathways, could be important to preview the efficacy of our approach as a future gene therapy strategy.

Simple measurement of tumor volume did not reveal a benefit when *in situ* gene therapy with p19Arf was applied in combination with IFN β . This method does not take into account possible immune activation that may play a role in controlling not only the primary tumor, but also the progression of metastases. In our previous work, we have shown that the combined treatment with p19Arf and IFN β is indeed associated with NK cell activation and prolonged survival in a prophylactic vaccine model as well as reduced tumor progression in a therapeutic vaccine approach.²⁴ We have also noted that tumor volume as an indicator of efficacy may be limiting since inhibition of tumor progression was associated with cell death only when the combination, but not IFN β alone, was applied.²³ In the present work, we explored the bystander effect as a possible benefit associated with the gene combination. Indeed, the influence of IFN β on non-transduced cells was confirmed *in vivo*, yet p19Arf was shown to sensitize B16 cells to IFN β *in vitro*.

At this moment, work is underway to elucidate the mechanism by which the combination of p19Arf and IFN β induce such high levels of cell death. Since both p53 and IFN β are associated with the induction of a large number of downstream transcriptional targets,^{37, 38} it seems likely that our gene transfer strategy promotes the expression of some critical factors that stimulate cell death. It remains to be determined whether the differential expression of p53 and/or IFN β target genes relies on one or both of these factors. It is possible that one or more key gene is induced in distinct pathways (i.e. p53 vs. IFN) or that a common gene is induced, but only in the presence of the combined treatment, or that simply the level of target gene expression is sufficient to bring about cell death.

Interactions of p53/Arf and IFN pathways have been shown to play a role in controlling virus infection including through the induction of cell death.^{16, 17} Here we have shown that the presence of the adenoviral vector, activation of the p53/Arf and IFN pathways is critical for the induction of high levels of cell death. Even though poly (I:C) induced expression of IFN β , significant cell death only occurred with concomitant inhibition of MDM2 and the presence of the viral vector. With these observations, we postulate that our gene transfer approach may be inducing an anti-viral response that is also an effective means of eliminating tumor cells.

As expected, IFN β treatment was associated with a bystander effect. To the best of our knowledge, this is the first report of IFN β bystander effect *in vivo* expressed *in situ* by an adenoviral vector. Interestingly, the presence of p19Arf in cells neighboring the IFN β -transduced cells resulted in increased sensitivity to the bystander effect. We propose that this phenomenon may follow the same mechanism that is employed by the direct transfer of both genes. However, we cannot exclude the possibility that cells respond to vectorized IFN β differently than they would to IFN β acting exclusively

through its receptor (i.e. the impact of intracellular vs. extracellular IFN β). We did show increased cell death upon treatment with vectorized IFN β , but have not determined if the cellular response follows a different pathway than that induced by the recombinant protein. In addition, we presume that the bystander effect is mediated principally by IFN β , but we cannot rule out the possibility that an as yet unidentified factor may play a role. Several studies have shown that gene transfer with IFN α results in the killing of cells resistant to the recombinant protein and that transduced cells secrete a factor other than IFN that participates in the killing of non-transduced tumor cells.^{39, 40}

To the best of our knowledge, gene therapy efforts with p14ARF have not been tested clinically. However, a few clinical trials using virus mediated transfer of IFN β have been described.⁴¹⁻⁴³ Such an approach is expected to result in localized high concentrations of IFN β and thus avoid the systemic toxicity seen when using large doses of the recombinant protein. Indeed, these early phase safety trials point to some instances of clinical benefit of IFN β gene therapy.

The work presented here represents a critical advance in the development of a novel gene therapy approach where endogenous p53, exogenous Arf and IFN β interact to bring about high-levels of transgene expression, cell death and immune stimulation. As shown here and in our previous work, the principal advantage of the combined gene transfer is the increase in cell death, induction of an anti-tumor immune response that stimulates both NK, CD4+ and CD8+ T cells, increased overall survival in a prophylactic vaccine model as well as impeded tumor progression in a therapeutic vaccine application.^{23, 24} We propose that the inclusion of ARF may complement the activity of IFN β , as described in our mouse model, and thus intensify the cellular response to treatment, representing an improvement over the current clinical uses of IFN β for the treatment of melanoma.

Acknowledgements: We are grateful for the cooperation of the laboratories of Dr. Jose Eduardo Krieger and Roger Chammas for their continued support and helpful discussions.

Conflict of interest statement: The authors declare no conflict of interest.

“Supplementary information is available at Human Gene Therapy’s website”

References:

1. Bhatia S, Tykodi SS, Thompson JA. Treatment of metastatic melanoma: an overview. *Oncology (Williston Park)* 2009;23:488-496.
2. Giglia-Mari G, Sarasin A. TP53 mutations in human skin cancers. *Hum Mutat* 2003;21:217-228.
3. Polsky D, Bastian BC, Hazan C et al. HDM2 protein overexpression, but not gene amplification, is related to tumorigenesis of cutaneous melanoma. *Cancer Res* 2001;61:7642-7646.
4. Sharpless E, Chin L. The INK4a/ARF locus and melanoma. *Oncogene* 2003;22:3092-3098.
5. Jochemsen AG. Reactivation of p53 as therapeutic intervention for malignant melanoma. *Curr Opin Oncol* 2014;26:114-119.
6. Lu M, Miller P, Lu X. Restoring the tumour suppressive function of p53 as a parallel strategy in melanoma therapy. *FEBS Lett* 2014;588:2616-2621.
7. Lee B, Sandhu S, McArthur G. Cell cycle control as a promising target in melanoma. *Curr Opin Oncol* 2015;27:141-150.
8. Strauss BE, Costanzi-Strauss E. pCLPG: a p53-driven retroviral system. *Virology* 2004;321:165-172.
9. Bajgelman MC, Strauss BE. Development of an adenoviral vector with robust expression driven by p53. *Virology* 2008;371:8-13.
10. Bajgelman MC, Medrano RF, Carvalho AC et al. AAVPG: A vigilant vector where transgene expression is induced by p53. *Virology* 2013;447:166-171.
11. Strauss BE, Bajgelman MC, Costanzi-Strauss E. A novel gene transfer strategy that combines promoter and transgene activities for improved tumor cell inhibition. *Cancer Gene Ther* 2005;12:935-946.
12. Merkel CA, da Silva Soares RB, de Carvalho AC et al. Activation of endogenous p53 by combined p19Arf gene transfer and nutlin-3 drug treatment modalities in the murine cell lines B16 and C6. *BMC Cancer* 2010;10:316.
13. Sato M, Taniguchi T, Tanaka N. The interferon system and interferon regulatory factor transcription factors -- studies from gene knockout mice. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2001;12:133-142.
14. Takaoka A, Hayakawa S, Yanai H et al. Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature* 2003;424:516-523.
15. Sandoval R, Xue J, Pilkinton M et al. Different requirements for the cytostatic and apoptotic effects of type I interferons. Induction of apoptosis requires ARF but not p53 in osteosarcoma cell lines. *J Biol Chem* 2004;279:32275-32280.
16. Munoz-Fontela C, Garcia MA, Garcia-Cao I et al. Resistance to viral infection of super p53 mice. *Oncogene* 2005;24:3059-3062.
17. Munoz-Fontela C, Macip S, Martinez-Sobrido L et al. Transcriptional role of p53 in interferon-mediated antiviral immunity. *J Exp Med* 2008;205:1929-1938.
18. Strauss BE, Costanzi-Strauss E. Gene Therapy for Melanoma: Progress and Perspectives. In: *Recent Advances in the Biology, Therapy and Management of Melanoma*. LM Davids, ed. (InTech Open Science). 2013.
19. Aoyagi S, Hata H, Homma E et al. Sequential local injection of low-dose interferon-beta for maintenance therapy in stage II and III melanoma: a single-institution matched case-control study. *Oncology* 2012;82:139-146.
20. Borden EC, Jacobs B, Hollovar E et al. Gene regulatory and clinical effects of interferon beta in patients with metastatic melanoma: a phase II trial. *J Interferon Cytokine Res* 2011;31:433-440.

21. Voelter-Mahlknecht S, Mahlkecht U, Letzel S et al. Phase 2 trial of the continuous IV administration of interferon-beta in patients with disseminated malignant melanoma. *Skinmed* 2006;5:271-276.
22. Matsumoto K, Kubo H, Murata H et al. A pilot study of human interferon beta gene therapy for patients with advanced melanoma by in vivo transduction using cationic liposomes. *Jpn J Clin Oncol* 2008;38:849-856.
23. Merkel CA, Medrano RF, Barauna VG et al. Combined p19Arf and interferon-beta gene transfer enhances cell death of B16 melanoma in vitro and in vivo. *Cancer Gene Ther* 2013;20:317-325.
24. Medrano RFV, Canani JPP, Ribeiro AH et al. Vaccination using melanoma cells treated with p19arf and interferon-beta gene transfer in a mouse model: A novel combination for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2016;In press.
25. Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O et al. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol* 2013;31:51-72.
26. Kepp O, Senovilla L, Vitale I et al. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncoimmunology* 2014;3:e955691.
27. Vacchelli E, Sistigu A, Yamazaki T et al. Autocrine signaling of type 1 interferons in successful anticancer chemotherapy. *Oncoimmunology* 2015;4:e988042.
28. Yamashita M, Ino A, Kawabata K et al. Expression of coxsackie and adenovirus receptor reduces the lung metastatic potential of murine tumor cells. *Int J Cancer* 2007;121:1690-1696.
29. Mizuguchi H, Koizumi N, Hosono T et al. A simplified system for constructing recombinant adenoviral vectors containing heterologous peptides in the HI loop of their fiber knob. *Gene Ther* 2001;8:730-735.
30. Wan YY, Leon RP, Marks R et al. Transgenic expression of the coxsackie/adenovirus receptor enables adenoviral-mediated gene delivery in naive T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:13784-13789.
31. Ghattas IR, Sanes JR, Majors JE. The encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site allows efficient coexpression of two genes from a recombinant provirus in cultured cells and in embryos. *Mol Cell Biol* 1991;11:5848-5859.
32. Peng HH, Wu S, Davis JJ et al. A rapid and efficient method for purification of recombinant adenovirus with arginine-glycine-aspartic acid-modified fibers. *Anal Biochem* 2006;354:140-147.
33. Sakurai M, Iigo M, Tamura T et al. Comparative study of the antitumor effect of two types of murine recombinant interferons, (beta) and (gamma), against B16-F10 melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 1988;26:109-113.
34. Vassilev LT. Small-molecule antagonists of p53-MDM2 binding: research tools and potential therapeutics. *Cell Cycle* 2004;3:419-421.
35. Gatti G, Nuñez NG, Nocera DA et al. Direct effect of dsRNA mimetics on cancer cells induces endogenous IFN- β production capable of improving dendritic cell function. *Eur J Immunol* 2013;43:1849-1861.
36. Núñez NG, Andreani V, Crespo MI et al. IFN β produced by TLR4-activated tumor cells is involved in improving the antitumoral immune response. *Cancer Res* 2012;72:592-603.
37. Beckerman R, Prives C. Transcriptional regulation by p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2:a000935.
38. Sen GC, Sarkar SN. The interferon-stimulated genes: targets of direct signaling by interferons, double-stranded RNA, and viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 2007;316:233-250.
39. Zhang X, Dong L, Chapman E et al. Conditioned medium from Ad-IFN-alpha-infected bladder cancer and normal urothelial cells is cytotoxic to cancer cells but not normal cells: further evidence for a strong bystander effect. *Cancer Gene Ther* 2008;15:817-822.

40. Zhang X, Yang Z, Dong L et al. Adenoviral-mediated interferon alpha overcomes resistance to the interferon protein in various cancer types and has marked bystander effects. *Cancer Gene Ther* 2007;14:241-250.
41. Wakabayashi T, Natsume A, Hashizume Y et al. A phase I clinical trial of interferon-beta gene therapy for high-grade glioma: novel findings from gene expression profiling and autopsy. *J Gene Med* 2008;10:329-339.
42. Yoshida J, Mizuno M, Fujii M et al. Human gene therapy for malignant gliomas (glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma) by in vivo transduction with human interferon beta gene using cationic liposomes. *Hum Gene Ther* 2004;15:77-86.
43. Yoshida J, Mizuno M, Wakabayashi T. Interferon-beta gene therapy for cancer: basic research to clinical application. *Cancer Sci* 2004;95:858-865.

Figure 1: Transduction with and expression from AdRGD-PG-eGFP (GFP). B16 cells were transduced with AdRGD-PG-eGFP (MOI=50) and treated or not with 100 ng/ml doxorubicin (+Dox). **(A)** The percentage of eGFP-positive cells was measured by flow cytometry. **(B)** The relative expression (intensity) of eGFP is given in arbitrary units (au), as determined by flow cytometry. Results from each graph represent the average and s.d. from three independent experiments. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, one-way analysis of variance, followed by Tukey's Multiple Comparison post-test.

Figure 2: Gene transfer of p19Arf and IFNβ inhibits proliferation and viability of B16 cells and induces accumulation of hypodiploid cells. B16 cells were transduced with the AdRGD-PG vector encoding the indicated transgene (MOI 100) and (A) replated for assessment of growth potential measured by counting viable cells each 24 hours during a 4 day period or (B) replated in 96-well plates and quadruplicate samples were stained for MTT assay every 24 hours in a 3 day experiment. Results from each graph represent the average and s.d. among at least duplicate samples from three independent experiments. $**P<0.01$; $***P<0.001$, two-way analysis of variance, followed by Bonferroni post-test. Cells were also harvested after 48 or 60 hours of transduction, fixed and stained with propidium iodide and analyzed by flow cytometry. (C) Evaluation of hypodiploid cells. (D) Cell cycle distribution. Results from each graph represent the average and s.d. from three independent experiments. $***P<0.001$ for all cell cycle phases, $##P<0.005$ for G0/G1 phase, $###P<0.001$ for G0/G1 phase, two-way analysis of variance, followed by Bonferroni post-test

Figure 3: Combination of p19Arf and IFN β induces immunogenic cell death. B16 cells were transduced with the AdRGP-PG vector encoding the indicated transgene (MOI 500) and analyzed 72 hours later. **(A)** Cells were collected for flow cytometric analysis of calreticulin exposure. **(B)** Cell supernatant was collected for measure of secreted ATP or **(C)** HMGB1 release by B16 cells. Graphs represent the average and s.d. from at least three independent experiments. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, one-way analysis of variance, followed by Tukey's Multiple Comparison post-test.

Figure 4: The induction of B16 cell death after p19Arf + IFN β treatment is dependent on transduction by an adenoviral vector. B16 cells were transduced with the AdRGD-PG vectors encoding the indicated transgene (MOI 500 or as stated in figure), treated with Nutlin-3 (10 μ M or as indicated), IFN-R (recombinant IFN β) or transfected with Poly (I:C) (0.2 μ g/mL or as stated in the panel) and, 72 hours after, collected for flow cytometric analysis of hypodiploid cells. (A) Combined pharmacologic treatment. (B) Use of Nutlin-3 instead of the p19Arf vector. (C) Use of IFN-R instead of the IFN β vector. (D) Production of IFN β upon transfection with Poly (I:C). (E) Use of Poly (I:C) in place of IFN-R. (F) Contribution of vector to cellular response upon pharmacological treatment. Results from each graph represent the average and s.d. from at least three independent experiments. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, one-way analysis of variance, followed by Tukey's Multiple Comparison post-test.

Figure 5: IFN β inhibits tumor growth and increases overall survival. (A) Schematic representation of the treatment approach. *In situ* gene therapy was evaluated where mice were inoculated with 1×10^6 B16 cells in the left flank, treated with 3 injections of 5×10^8 infectious units (i.u.) of AdRGD-PG vectors. (B) Tumor growth. Results represent the average and s.d. of tumor volumes (mm^3) of at least 4 animals in each group. *** $P < 0.001$, two-way analysis of variance, followed by Bonferroni post-test. (C) Survival of these animals was also monitored. Animals were euthanized when tumor volume exceeded 2000 mm^3 . *** $P < 0.001$, log-rank Mantel-Cox test.

Figure 6: p19Arf can sensitize cells to the bystander effect of IFN β . Cells were transduced with AdRGD-PG vector encoding the indicated transgene (MOI 50), mixed in the indicated proportions in 6-well plates. **(A)** B16 cells were harvested 72 hours post-transduction and accumulation of hypodiploid cells was revealed by P.I. staining and flow cytometry. **(B)** B16ISRE-GFP-Luc cells were harvested 48 hours post-transduction and the percentage of eGFP-positive cells was measured by flow cytometry. Results from each graph represent the average and s.d. from three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, one-way analysis of variance, followed by Tukey's Multiple Comparison post-test. **(C)** Schematic representation of *in vivo* treatment regime. For detection of the IFN β bystander effect *in vivo*, mice were inoculated with 1×10^6 B16ISRE-GFP-Luc cells in the left flank, treated with 3 injections of 5×10^8 infectious units (i.u.) of AdRGD vectors every two days and tumor was collected 1 day after the last injection. **(D)** Detection of GFP indicates level of B16 transduction by AdRGD-PGeGFP or bystander effect of AdRGD-PG-IFN β vectors. **(E)** Detection of luciferase activity reveals lack of bystander effect by AdRGD-PGeGFP, but influence of AdRGD-PG-IFN β . * $P < 0.05$, t-test, followed by Mann Whitney post-test.

Figure S1: RGD-modified vector efficiently transduces CAR-negative cells. Parental B16 and B16mCAR (with forced expression of murine CAR) were transduced under identical conditions and later stained to reveal β -galactosidase activity.

Figure S2: Schematic representation of the AdRGD-PG vectors. ITR: adenoviral replicative inverted terminal repeats; attR1 and attR2: site-specific recombination sequences; PG/Tx/βglob: p53-responsive promoter, composed by PG enhancer sequence, TATA box (Tx) and βglobin (βglob) intronic sequences;; eGFP: green fluorescent protein cDNA sequence; p19Arf: p19Arf cDNA sequence; IFNβ: mouse interferon-β cDNA sequence; IRES: internal ribosome entry site sequence; PA: polyadenylation sequence; V5 epitope: V5 epitope of adenoviral capsid sequence; ΔE1/E3: deletion of genes E1 and E3.

Figure S3: Reliable p19Arf transgene expression from the mono- and bicistronic AdRGD-PG vectors. Exogenous p19Arf detected by immunofluorescence. B16 cells were transduced with a MOI of 25 with the indicated vectors and, 48 hours later, fixed with methanol and exposed to a polyclonal antibody for p19Arf prior to an Alexa-488 anti-rabbit secondary antibody. Cells were then stained with Hoechst 33258. Merge refers to the combined images of the green and blue channels.

Figure S4: Reliable IFN β transgene expression from the mono- and bicistronic AdRGD-PG vectors. B16 cells were transduced with a multiplicity of infection (MOI) of 25 with the indicated vectors and the medium where B16 were cultivated was collected 48 hours later for detection of IFN β by ELISA. Results from each graph represent the average and s.d. from three independent experiments. *** $P < 0.001$, one-way analysis of variance, followed by Tukey's Multiple Comparison post-test.