AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

EXPRESSÃO DE ENDOSTATINA EM FIBROBLASTOS MURINOS PARA TRATAMENTO DE TUMORES SÓLIDOS

PAULA HUVOS TORNIERI

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações.

Orientadora:
Dra. Ligia Ely Morganti Ferreira Dias

São Paulo
2003

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

EXPRESSÃO DE ENDOSTATINA EM FIBROBLASTOS MURINOS PARA TRATAMENTO DE TUMORES SÓLIDOS

PAULA HUVOS TORNIERI

IPEN
LIVRO
Nº 22722
BIBLIOTECA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações.

Orientadora:
Dra. Ligia Ely Morganti Ferreira Dias

São Paulo
2003

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP-IPEN

À minha avó Catharina e ao meu avô Miguel,
dedico este trabalho com muito amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Ligia Ely Morganti Ferreira Dias pela orientação e apoio na realização deste trabalho.

À Dra. Monica Beatriz Mathor pela colaboração, sugestões e constante apoio.

À amiga Patrícia Alves do Nascimento pela colaboração e incentivo constantes e sobretudo pela amizade.

À amiga Paula Amaral Gurgel pela colaboração na realização de ensaios e pela sua amizade.

Ao Dr. Patrick Spencer pelas discussões, sugestões e apoio na realização de alguns ensaios.

À Dra. Maria Helena Marumo pelas discussões e apoio na realização de alguns ensaios e na elaboração desta tese.

À todos os colegas do LBM pelo auxílio e apoio.

Ao André Bonini Sousa pelo incentivo e apoio na realização deste trabalho e pela sua paciência e carinho.

Aos meus pais por me oferecerem a oportunidade de realização deste trabalho e pelo incentivo constante.

Ao CNPq pela concessão de bolsa de estudo.

À FAPESP pela concessão dos recursos financeiros para realização deste projeto.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

Não existe nada de completamente errado, mesmo um relógio parado consegue estar certo duas vezes por dia
É preciso ter confiança na capacidade que cada pessoa tem de ensinar a si mesma
As decepções, as derrotas, o desânimo são ferramentas que Deus utiliza para mostrar a estrada
O caminho da sabedoria é não ter medo de errar
Quando você encontrar uma coisa importante na vida, não quer dizer que precise renunciar a todas as outras
Quanta coisa se perde por medo de perder
Só aceitando nossos desejos é que podemos ter uma idéia de quem somos
O que está dentro é mais difícil de mudar do que aquilo que está fora.
Toda pergunta que pode ser concebida tem uma resposta
Nenhum sentimento, como o amor, envelhece junto com o corpo. Os sentimentos fazem parte de um mundo que não conhecemos, mas é um mundo onde não existe tempo, nem espaço, nem fronteiras
E muitas derrotas, mas também muitas conquistas ficam para trás
Valentes são aqueles que tomam decisões com medo.

Autoria desconhecida

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP-IPEN

EXPRESSÃO DE ENDOSTATINA EM FIBROBLASTOS MURINOS PARA TRATAMENTO DE TUMORES SÓLIDOS

Paula Huvos Tornieri

RESUMO

O crescimento de tumores sólidos e suas metástases é dependente do processo de angiogênese. A terapia gênica antiangiogênica representa portanto, uma ferramenta promissora para o tratamento de câncer. Foi demonstrado por O'Reilly (1997) que a endostatina, um fragmento C-terminal do colágeno XVIII com peso molecular de 20 kDa inibe potencialmente o crescimento de tumores sólidos implantados em camundongos. Neste trabalho reportamos a clonagem do gene da endostatina murina no vetor de expressão em células de mamíferos pSecTag2 e a transfecção deste vetor na linhagem de fibroblastos LM(TK-) provenientes de camundongos C3H. A expressão de endostatina recombinante foi obtida introduzindo-se o cDNA da endostatina murina com ou sem códons para 6 resíduos de histidina a jusante ao promotor forte de citomegalovirus humano. A endostatina foi fundida na porção N-terminal à seqüência do peptídio sinalizador da cadeia Kappa de uma imunoglobulina murina, o que direciona sua secreção. Os fibroblastos murinos LM (TK-) foram transfectados estavelmente pelo método de precipitação do DNA com fosfato de cálcio. A endostatina murina recombinante foi expressa na forma solúvel no meio de cultura das células transfectadas selecionadas com hygromicina (600 μg/mL), em concentrações de até 383,4 ng/10^6 células/dia. A atividade biológica da endostatina recombinante expressa no meio condicionado foi demonstrada pela sua habilidade em inibir a proliferação das células endoteliais C-PAE. Este sistema de expressão poderá ser de grande valia na aplicação para estudos "in vivo" de terapia gênica.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP-IPEN

ENDOSTATIN EXPRESSION IN MURINE FIBROBLASTS FOR SOLID TUMORS TREATMENT

Paula Huvos Tornieri

ABSTRACT

The growth of solid tumors and its metastasis is angiogenesis dependent. Antiangiogenic gene therapy may represent a promising approach to cancer treatment. It was first demonstrated by O'Reilly (1997) that endostatin, a 20 kDa C-terminal fragment of collagen XVIII, potently inhibits tumor growth in mice. Here we report the cloning of murine endostatin cDNA in the mammalian expression vector pSecTag2, and the transfection of this vector into a fibroblast LM(TK-) cell line from C3H mice. The recombinant endostatin was expressed by introducing the murine endostatin cDNA with or without codons for 6 histidine residues downstream of the strong promoter human CMV. Endostatin is fused at the N-terminus to the murine Ig kappa chain leader sequence for its secretion. The LM(TK-) murine fibroblasts were stably transfected by calcium phosphate-DNA precipitation. The recombinant murine endostatin was expressed in a soluble form in conditioned medium of transfected cells selected with hygromicin (600 μg/mL), at concentrations up to 383,4 ng/10^6 cells/day. The biological activity of expressed recombinant endostatin in conditioned medium was demonstrated by its ability to inhibits the proliferation of C-PAE endothelial cells. This expression system may be particularly promising for *in vivo* studies of gene therapy.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP-IPEN

SUMÁRIO

Página

1. INTRODUÇÃO 01

2. OBJETIVOS 10

3. METODOLOGIA 11

3.1. Construção do vetor de expressão contendo o cDNA do gene da endostatina murina 11

3.1.1. Obtenção do fragmento de DNA contendo o gene da endostatina 11

3.1.2. Obtenção do pSecTag2 linearizado 12

3.1.3. Reação da ligação do gene da endostatina murina ao vetor de expressão pSecTag2/ Hydro A 14

3.1.4. Transformação de bactérias *E.coli* cepa DH5α para amplificação e purificação do produto da reação de ligação 14

3.1.5. Mutagênese 15

3.1.5.1. Oligonucleotídios a serem utilizados com iniciadores 15

3.1.5.2. Fosforilação dos oligonucleotídios 16

3.1.5.3. Preparação do DNA de fita simples (sfDNA) 16

3.1.5.4. Reação de Mutagênese 17

3.2. Transformação, seleção e amplificação das células aucariotas 18

3.2.1. Determinação da concentração mínima letal de higromicina para as células LM(TK-) 18

3.2.2. Transfecção das células utilizando o método de precipitação do DNA com fosfato de cálcio 19

3.2.3. Isolamento e amplificação dos clones positivos 21

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP-IPEN

3.2.4. Preparo e coleta do meio condicionado 22
3.3. Caracterização e quantificação da endostatina recombinante 22
3.3.1. Western Blotting 22
3.3.1.1. SDS - PAGE 22
3.3.1.2. Transferência 23
3.3.1.3. Imumoreação 23
3.3.2. Imunoensaio (ELISA - Kit Accucyte) 23
3.4. Análise da atividade biológica da endostatina recombinante 25
3.4.1. Ensaio de proliferação das células endoteliais 25
4. RESULTADOS 27
4.1. Construção do vetor de expressaõ contendo o cDNA do gene da endostatina murina 27
4.1.1. Obtenção do fragmento de DNA contendo o gene da endostatina 27
4.1.2. Obtenção do pSecTag2 linearizado 27
4.1.3. Reação da ligação do gene da endostatina murina ao vetor de expressão pSecTag2/ Hydro A 28
4.1.4. Mutagênese 30
4.1.4.1. Reação de mutagênese 30
4.2. Transformação, seleção e amplificação das células eucariotas 36
4.2.1. Determinação da concentração mínima letal de higromicina para as células LM(TK-) 36
4.2.2. Transfecção das células utilizando-se o método de precipitação do DNA com fosfato de cálcio 36
4.2.3. Isolamento e amplificação dos clones positivos 38
4.3. Quantificação da endostatina recombinante 39
4.3.1. Imunoensaio (ELISA - Kit Accucyte) 39
4.4. Caracterização e análise da atividade biológica da endostatina recombinante 40

4.4.1. Western Blotting 40

4.4.2. Ensaio de proliferação das células endoteliais 41

5. DISCUSSÃO 44

6. CONCLUSÕES 57

7. REFERËNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 58

1. INTRODUÇÃO

Muitos dos estudos clínicos de terapia gênica, pelo menos 50%, são para o tratamento de câncer e quase todos têm como alvo a célula cancerosa (Folkman, 1998).

A introdução de genes que permitem às células tumorais expressarem moléculas tóxicas, a prevenção ou correção de defeitos genéticos, o aumento da imunogenicidade às células tumorais ou o aumento da sensibilidade das células tumorais às drogas estão entre as estratégias estudadas (Cao e cols., 1998).

Estudos realizados por Lin e cols., 1998, Goldman e cols., 1998, entre outros estudos recentes de terapia gênica experimental antiangiogênica, revelam o surgimento de uma nova extensão da terapia gênica dirigida para inibição da neovascularização em tumores (Cao e cols., 1998).

Os vasos sangüíneos são compostos fundamentalmente por células endoteliais, que se conectam para formar os tubos que direcionam e mantém o fluxo sangüíneo e a perfusão para os tecidos. Durante a embriogênese, os vasos sangüíneos se desenvolvem mediante dois tipos de processos: vasculogênese, onde as células endoteliais se originam de células precursoras e angiogênese, onde os novos capilares brotam de vasos existentes. Em adultos os novos vasos são produzidos somente pela angiogênese; normalmente a vasculatura é quiescente, tornando-se ativa sob estímulo apropriado (revisado em Hanahan e Folkman, 1996).

Fisiologicamente, esse processo é requerido nos ciclos reprodutivos femininos (ovulação, menstruação, gravidez) e na regeneração de órgãos e tecidos (Hanahan e Folkman, 1996). Uma exceção importante é o processo de

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP-IPEN

cicatrização de feridas, que depende do crescimento de novos vasos no tecido danificado. Devido ao fato de os pacientes com tumores sólidos necessitarem freqüentemente de cirurgias para a retirada de tumores, a inibição de resposta na cicatrização criaria um sério problema para os pacientes tratados com moléculas antiangiogênicas. No entanto, estudos realizados por Bloch e cols. (2000) e por Berger e cols. (2000) demonstraram que a inibição da angiogênese nas condições estudadas pelos autores reduziu o número de vasos sanguíneos funcionais no local (subcutâneo) das lesões provocadas (Bloch e cols., 2000), mas não afetou significativamente o processo de cicatrização, em animais tratados com uma substância antiangiogênica, a endostatina.

A neovascularização também é muito importante na patogênese de muitas doenças como isquemia cardíaca, doenças da pele e retinopatia (Folkman, 1995) e principalmente no crescimento de tumores sólidos (Kim e cols., 1993). Várias evidências sugerem que a angiogênese é essencial para o crescimento e sobrevivência de tumores sólidos e suas metástases (Folkman, 1989, Hori e cols., 1991, Kim e cols., 1993, Milauer e cols., 1994).

Em um estágio pré-vascular um tumor sólido raramente cresce mais do que 2 a 3 mm e pode conter alguns milhões de células. As células de tumores pré-vasculares podem proliferar tão rapidamente quanto as de um tumor em expansão, no entanto, a taxa de crescimento de células em tumores sem neovascularização fica em equilíbrio com a sua taxa de mortalidade. Uma vez que o tumor se torna vascularizado, ele cresce exponencialmente. A infiltração de novos vasos sangüíneos supre as células tumorais de oxigênio e nutrientes e remove os produtos do seu metabolismo (Folkman, 1995).

O aumento da população celular tumoral é precedido por um aumento de novos capilares nas proximidades do tumor e a angiogênese pode facilitar a formação de metástases aumentando a saída de células tumorais do sítio primário e sua entrada na circulação sanguínea através destes capilares, que

são mais permeáveis do que os vasos maduros normais (revisado em Dvorak e cols., 1995; Hanahan e Folkman, 1996; John e cols., 1999).

Foi descrito que as células tumorais regulam a produção de uma variedade de fatores angiogênicos (Pepper e cols., 1992). Estes fatores, dos quais os mais importantes são os "fibroblast growth factors" (forma ácida ou aFGF e forma básica ou bFGF) (Kandel e cols., 1991; Hori e cols., 1991; Nguyen e cols., 1994) e "vascular endothelial cell growth factor" ou "vascular permeability factor" (VEGF/VPF) (Boocock e cols., 1995, Kim e cols., 1993) apresentam ação mitogênica sobre as células endoteliais. Estes dois fatores possuem ação sinergística. Existe uma elevação da expressão de VEGF pelas células endoteliais em condição de hipóxia (Shweiki e cols., 1992).

Muitos tumores malignos também produzem inibidores de angiogênese (Chen e cols., 1995) e entre estes estão incluídos a angiostatina (O'Reilly e cols., 1994; Gately e cols., 1996), a trombospondina (Good e cols., 1990) e a endostatina (O'Reilly e cols., 1997, Bergers, e cols., 1999), os quais podem modular a angiogênese, tanto no tumor primário quanto em suas metástases. Alguns dos mais potentes inibidores de angiogênese são fragmentos derivados de proteínas extracelulares abundantes, as quais não regulam a angiogênese, são os casos da angiostatina, que é derivada do plasminogênio e da endostatina, que é derivada do colágeno XVIII.

O fenótipo angiogênico de um tumor aparentemente é o resultado entre o balanço dos reguladores positivos e negativos da neovascularização (Rastinejad e cols., 1989; Good e cols., 1990; O'Reilly e cols., 1994, Parangi e cols., 1996).

A elevação da concentração de inibidores endógenos da angiogênese deveria levar a um balanço a favor da inibição da neovascularização. Assim, sem um fluxo sanguíneo efetivo, as células tumorais morreriam por falta de oxigênio e nutrientes. A inibição da angiogênese torna-se, portanto, uma

promissora via de acesso para o tratamento do câncer. Várias substâncias antiangiogênicas têm demonstrado inibir o crescimento de tumores primários além das metástases, em modelos animais.

Dentre os inibidores de angiogênese mais promissores para o tratamento de tumores sólidos humanos pode-se ressaltar a endostatina e a associação endostatina+angiostatina (Kong e Crystal, 1998; Zetter, 1998; Gasparini, 1999 e Cristofanilli e cols., 2002).

A endostatina, um fragmento C-terminal (184 aa) do colágeno XVIII de 20 kDa tem sido demonstrada como um inibidor específico de proliferação e migração de células endoteliais e angiogênese (Dhanabal e cols., 1999[a]; Sauter e cols., 2000). Esta proteína, descrita por O'Reilly e cols. (1997) foi purificada do produto de secreção de uma linhagem celular murina de hemangioendotelioma e suprime de uma maneira dose-dependente, o crescimento de uma variedade de tumores primários murinos (O'Reilly e cols., 1997). No entanto, os mecanismos de liberação proteolítica e seu modo de ação permanecem indefinidos (John e cols., 1999).

Vários autores demonstraram que a endostatina recombinante, solúvel e insolúvel, suprime o crescimento de tumores primários humanos e murinos e também de suas metástases (Bohem e cols., 1997; O'Reilly e cols., 1997; John e cols., 1999; Dhanabal e cols., 1999a; Yokoyama e cols., 2000). Além disso, a endostatina bloqueia especificamente a angiogênese dos tumores em diferentes modelos animais, sem efeitos colaterais óbvios (John e cols., 1999)

O tratamento com endostatina (20mg/Kg/dia) levou à quase completa regressão (estado de microtumores) de diferentes modelos de tumores primários (carcinoma de pulmão de Lewis, fibrosarcoma T241, hemangioendotelioma EOMA e melanoma B16F10) estabelecidos (O'Reilly e cols., 1997). O crescimento de metástases de tumor de pulmão de Lewis após a

remoção do tumor primário foi quase completamente suprimido pela administração de endostatina, enquanto nos camundongos tratados com solução salina, as metástases desenvolveram-se rapidamente (O'Reilly e cols., 1997). Em um trabalho relacionado, Boehm e cols. (1997) mostraram que o tratamento com endostatina não induz os tumores à resistência, mesmo após 6 ciclos de tratamento descontinuado e que após a terapia antiangiogênica os tumores se apresentaram em estado de dormência prolongada. Este estado de dormência dos tumores após tratamentos descontínuos também foi observado por Perletti e cols. (2000) no tratamento de ratos, utilizando-se endostatina recombinante de rato. O mecanismo pelo qual isso acontece permanece desconhecido (Perletti e cols., 2000).

O tratamento de tumores e metástases utilizando a endostatina, apresenta algumas vantagens sobre a quimioterapia convencional:

1) As células endoteliais são normais, diplóides, geneticamente estáveis e representam alvo uniforme se comparadas às células tumorais, com alta instabilidade genética e mais propensas a criar mecanismos de resistência às drogas;

2) O endotélio vascular é um alvo que pode ser facilmente atingido por agentes antiangiogênicos, administrados sistemicamente;

3) A endostatina é altamente específica para células endoteliais ativadas. Sob condições fisiologicamente normais com exceção dos órgãos reprodutores femininos, as células endoteliais não se dividem.

4) A endostatina possui baixa toxicidade e não causa resposta imunológica por se tratar de uma proteína endógena.

5) A endostatina muito provavelmente tem ação sobre diferentes tipos de tumores, pois, sua atuação é sobre o endotélio e não sobre as células tumorais.

Diferentemente do que ocorre com a quimioterapia convencional, não foi ainda descrito o desenvolvimento de resistência para a terapia

antiangiogênica, indicando que o tratamento prolongado com essas drogas deve ser efetivo. A terapia antiangiogênica para o câncer e outras doenças, está em primeiro plano nas pesquisas biomédicas. Vários agentes antiangiogênicos estão em vários estágios das fases I, II e III de triagens clínicas em hospitais nos Estados Unidos (Berger e cols., 2000). A endostatina encontra-se nas fases I e II de triagens clínicas (Kerbel e Folkman, 2002).

Folkman (1998), comenta sobre a terapia gênica antiangiogênica para o tratamento de tumores e, segundo ele, este tipo de terapia sozinha ou em combinação com outros tipos de terapia convencional ou terapia gênica, poderia ser interessante após a retirada de tumores primários ou após radioterapia para impedir o crescimento de metástases.

Aparentemente para a terapia antiangiogênica ser efetiva, no tratamento de tumores, os efeitos antiangiogênicos devem ser mantidos durante longo tempo (Folkman, 1998). O autor sugere ainda que a terapia antiangiogênica mais eficaz seria aquela em que existe a presença contínua do inibidor no sangue, o que seria mais eficientemente obtido por meio de terapia gênica.

Se assumirmos que as células sobreviventes do tumor possuem o potencial para expressar mediadores proangiogênicos, a interrupção da terapia antiangiogênica apresenta o risco potencial de deslocar o equilíbrio a favor da angiogênese, permitindo ao tumor emergir de seu estado de dormência. Uma terapia efetiva para o tratamento antiangiogênico deveria, portanto apresentar um efeito constante.

Os tratamentos com endostatina citados na literatura utilizam injeções diárias de 20 mg/kg/dia para obtenção de completa regressão tumoral (Bohem e cols., 1997; O'Reilly e cols., 1997; Hahnfeldt e cols., 1999; Perletti e cols., 2000 e Huang e cols., 2001).

Em um estudo recente Kisker e cols. (2001), mostram que a administração contínua de endostatina, realizada utilizando-se uma mini bomba osmótica implantada na cavidade peritoneal de camundongos, diminui a dose requerida (10x) para o tratamento além de melhorar a eficiência da terapia com endostatina em vários modelos tumorais humanos e murinos. Além disso, a redução da dose efetiva possibilita um aumento da supressão tumoral. A endostatina administrada continuamente via mini bomba osmótica manteve uma concentração sistêmica de 200-300 ng/mL durante sete dias. Os autores mostraram que a administração contínua de endostatina resulta em uma supressão tumoral com doses menores comparando-se com a dose necessária pela injeção diária. Uma dose de 2 mg/kg/dia administrada continuamente resultou em uma supressão do crescimento tumoral equivalente à obtida pela injeção diária de 20 mg/kg/dia.

De acordo com Kerbel e Folkman (2002), os inibidores de angiogênese são mais eficazes quando administrados de uma maneira que mantenha uma concentração constante do inibidor na circulação.

Uma forma de terapia gênica que resulta na liberação contínua da proteína de interesse seria através da utilização de um sistema de encapsulamento de células que secretem a proteína de interesse.

Foi recentemente descrito o tratamento antiangiogênico de tumores utilizando dispositivos de imunoisolamento. Joki e cols. (2001) e Read e cols. (2001a e 2001b) utilizaram células produtoras de endostatina em microcápsulas de Alginato para tratamento de tumores. Este tipo de dispositivo apresenta a desvantagem de não poder ser retirado em caso de efeitos indesejáveis ou quando o tratamento for completado e a quantidade de células encapsuladas pode ser outro fator limitante. No trabalho de Read e cols. (2001b) foram implantadas cerca de 4 cápsulas por animal com 500-700 células/cápsula. Além disso, este tipo de material não induz a

neovascularização o que propiciaria uma melhor troca de pequenas moléculas de oxigênio e nutrientes entre as células implantadas e o tecido do hospedeiro.

Joki e colaboradores (2001) mostraram que a administração contínua de endostatina através de células contidas em microcápsulas ($2x10^5$ células encapsuladas por animal) resultou em 62.2% de inibição do crescimento tumoral de glioblastoma em comparação aos animais controles, 21 dias após a injeção das microcápsulas. A concentração da endostatina secretada por $2x10^5$ células encapsuladas mantidas em cultura em um período de seis semanas foi 150,2 ng/ml/semana; e este resultado *in vitro*, segundo os autores, indica a concentração liberada *in vivo*. Os autores sugerem que a utilização de uma quantidade maior de células encapsuladas poderia resultar em uma maior inibição tumoral.

Read e colaboradores (2001) obtiveram microcapsulas produzindo cerca de 0,2 μg/ml de endostatina durante um período de 48 horas o que resultou na indução de apoptose, hipoxia e várias áreas necróticas avasculares em 77% dos tumores tratados em comparação aos tumores não tratados onde não foi observada nenhuma das condições acima citadas.

Sim e cols. (1999) relatam que a meia-vida da endostatina recombinante humana em camundongos após a injeção subcutânea de 50 mg/kg/dia é de aproximadamente 10 horas. A injeção diária desta concentração de endostatina proporciona um pico da proteína no nível plasmático, mas não um nível contínuo de endostatina.

Já foi descrita a expressão "in vitro" de endostatina recombinante humana (Dhanabal e cols., 1999a; Taddei e cols., 1999 e Duan e cols., 1999, He e cols., 2000), de camundongo (O'Reilly e cols.,1997; Park e cols., 1999; Dhanabal e cols., 1999b; You e cols., 1999, Huang e cols., 2000; Park e cols., 2001 e Xu e cols., 2002) e de rato (Perletti e cols., 2000) em *Escherichia coli*, em *Pichia Pastoris*, em sistema de baculovirus e também em células de

Drosophila melanogaster. Foi também descrita a expressão de endostatina murina no leite de camundongas transgênicas (Zavadaskaya e cols., 2001), em células eucariotas por meio de infecção com vetores adenovirais (Kuo e cols., 2001), em células hematopoiéticas transduzidas (Pawliuk e cols., 2002), e em células renais de embrião humano transfectadas transientemente com vetor de expressão contendo o gene da endostatina (Hohenester e cols., 1998; Sasaki e cols., 1998).

2. OBJETIVOS

No presente estudo é nosso objetivo a produção de endostatina recombinante de camundongo em fibroblastos murinos por meio de transfecção de um vetor plasmidial de expressão contendo um peptídeo sinalizador e o gene da endostatina. As células transfectadas estavelmente secretando endostatina podem ser utilizadas para a produção desta proteína com interesse terapêutico em modelos animais.

Os fibroblastos geneticamente modificadas também serão utilizadas para a realização de um projeto em andamento no LBM de terapia gênica. Este projeto utilizará as células secretoras de endostatina para introdução em dispositivos de imunoisolamento (biohíbrido) para o tratamento de tumores induzidos em camundongos. Este projeto foi concebido por considerarmos que o uso de células eucariotas transplantadas, produtoras de endostatina recombinante liberada durante longo período na circulação, seria uma alternativa útil para o tratamento antiangiogênico de tumores e metástases.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP-IPEN

3. MÉTODOS

3.1. Construção do vetor de expressão contendo o cDNA do gene da endostatina murina

3.1.1. Obtenção do fragmento de DNA contendo o gene da endostatina

O gene da endostatina murina foi fornecido pela American Type Tissue Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA)(nº 63404) na célula hospedeira *Escherichia coli* HB 101, na forma de cDNA no vetor plasmidial pETKH-1. Estas células foram semeadas em placa LB (meio Luria Bertani → 0,5% de extrato de levedura, 1% de triptona e 1% de NaCl) contendo 1% de ágar, acrescido de ampicilina (100μg/mL) e cultivadas em estufa à temperatura de 37°C durante um período de 20 horas. A amplificação das bactérias foi realizada em meio LB líquido acrescido de ampicilina (100μg/mL) à temperatura de 37°C, com agitação de 180 rotações por minuto, durante um período de 16 horas. Esta cultura foi então submetida ao procedimento de minipreparação de DNA para purificação do vetor contendo o gene da endostatina, utilizando-se o kit QIAGEN que utiliza mini colunas de afinidade por DNA após lise alcalina. Bactérias competentes *E.coli* cepa DH5α foram submetidas à eletroporação (força do campo elétrico em cubeta de 0,1 cm= 15000V/cm) para transformação juntamente com o DNA plasmidial purificado. As bactérias transformadas foram então seleciondadas em LB ágar 1% contendo ampicilina, amplificadas e o DNA plasmidial foi purificado como descrito anteriormente, utilizando-se o kit Qiagen. Uma alíquota da amostra resultante foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, juntamente com o marcador de DNA, para confirmar a presença do plasmídeo e para sua quantificação.

O plasmídeo pETKH1 (10 μg) foi digerido com 40 unidades da enzima de restrição Nhe I em tampão adequado, em seguida o DNA foi purificado, para retirada da enzima Nhe I, pela extração com fenol/clorofórmio e precipitado. A seguir o DNA foi ressuspenso em água e tratado com o fragmento de Klenow da DNA polimerase I (6,4 unidades) em tampão adequado, juntamente com 0,25 mM dos 4 nucleotídeos para obtenção de extremidades cegas de DNA. A seguir o fragmento de Klenow foi inativado pelo aquecimento a 65°C por 15 minutos e o DNA foi novamente digerido, desta vez com a enzima Kpn I (80 unidades). Obteve-se assim um fragmento de DNA de aproximadamente 620 pares de bases (pb) contendo a extremidade a 5' do gene coesiva (Kpn I) e a extremidade a 3' do gene cega. A amostra foi aplicada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e realizada a eletroforese, juntamente com o marcador de DNA, para confirmação das digestões. Após a confirmação, o fragmento de DNA contendo o gene da endostatina foi submetido à purificação. A purificação foi realizada por separação em eletroforese em gel de agarose a 1%. A banda de DNA desejada corada com brometo de etídio no gel de agarose foi cortada e a purificação do DNA contido no gel foi feita utilizando-se o kit de purificação de DNA em gel de agarose, da marca Life Technologies, seguindo-se o protocolo. Uma alíquota da amostra foi aplicada em gel de agarose 1% e submetida à eletroforese para confirmação da purificação e para uma quantificação aproximada do fragmento purificado.

3.1.2. Obtenção do pSecTag2 linearizado

O vetor de expressão para células de mamífero pSecTag2 hygro A (Figura 1) utilizado para clonagem do gene da endostatina foi fornecido purificado pela Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). O plasmídeo (10 μg) foi digerido com as enzimas de restrição Kpn I (40 unidades) e Eco RV (40

unidades) por duas horas em banho-maria a 37°C em tampão adequado. Após a digestão o DNA foi aplicado juntamente com um marcador de DNA em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio e, realizada uma corrida eletroforética, para sua purificação. O fragmento de DNA de 5700 pb contido no ágar após a corrida eletroforética foi purificado e posteriormente quantificado como já descrito no ítem anterior (3.1.1.)

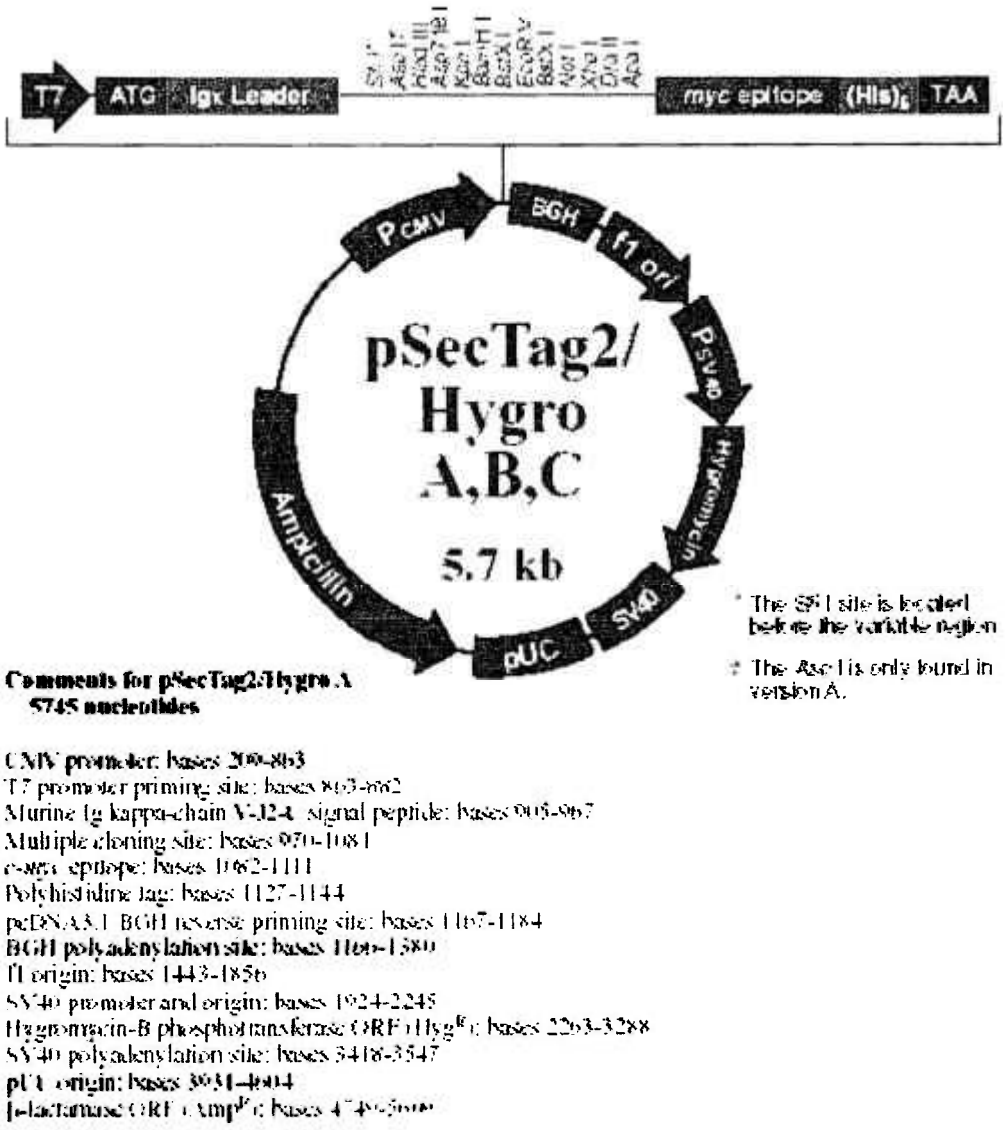


Figura 1: Mapa do vetor pSecTag2/hygro A.

3.1.3. Reação de Ligação do gene da Endostatina murina ao vetor de expressão pSecTag2/Hygro A

Foi realizada a inserção do fragmento de DNA contendo o gene de interesse (endostatina murina) no vetor de expressão para células de mamífero pSecTag2. A reação de ligação do inserto ao vetor foi realizada utilizando-se DNA na proporção molar de 2 moléculas de inserto para 1 molécula de vetor (total de 130 ng de DNA em um volume de 10 μl). Para a reação de ligação utilizou-se ainda 6,4 unidades da enzima T_4DNA ligase e 1mM de ATP em tampão adequado e a incubação foi efetuada por 16 horas a 4°C. Após este período a enzima foi inativada incubando-se a 65°C por 10 minutos.

O DNA foi então precipitado. O pellet foi seco em centrífuga liofilizadora e ressuspenso em 25 μl de água destilada.

3.1.4. Transformação de bactérias *E. coli* cepa DH5α para amplificação e purificação do produto da reação de ligação

As bactérias DH5α eletrocompetentes foram submetidas a eletroporação (força do campo elétrico em cubeta de 0,1 cm= 15000V/cm) com 2 μl do produto da reação de ligação. Dezoito das colônias selecionadas em LB ágar 1% contendo ampicilina, foram amplificadas e purificadas utilizando-se o kit Qiagen. Os DNAs resultantes foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição KpnI e XhoI e análise por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, para confirmação da ligação do inserto ao vetor. Além disso, duas amostras que apresentaram o resultado esperado após a análise de restrição foram enviadas para sequenciamento de DNA, utilizando-se como iniciador um oligonucleotídeo contendo a sequência do promotor de T7 (5' TAATACGACTCACTATAGG 3'), cuja sequência complementar está presente no vetor pSecTag2, a 5' do gene clonado. O

sequenciamento foi realizado no Instituto de Química da USP, no laboratório de bioinformática. Este sequenciamento foi necessário, pois não foi informado pela ATCC a seqüência de nucleotídeos a 5' do gene da endostatina, dado este, que seria imprescindível para a mutagênese.

3.1.5. Mutagênese

3.1.5.1. Oligonucleotídeos a serem utilizados como iniciadores

A fim de serem utilizados como iniciadores na reação de mutagênese sítio-dirigida, foram desenhados dois oligonucleotídeos, os quais foram adquiridos da empresa Life Technologies. Estes oligonucleotídeos foram desenhados baseando-se no sequenciamento de um dos clones com a construção plasmidial correta (14), além dos mapas de restrição dos vetores pETKH-1 e pSecTag2/hygro A. Eles foram ainda desenhados para serem complementares à fita 5'-3' do DNA.

Sequência do oligonucleotídeo 1 (SP+end.)

5`TGGCTGAAAGTCCTGATGAGTATGACCAGTGGAACCTGGAACCCA 3`

•complementar ao cDNA do gene da endostatina •complementar ao vetor pSectag2/hygro A

Sequência do oligonucleotídeo 2 (SP+6H+M+end.)

5`TGGCTGAAAGTCCTGATGAGTATGCATATGGTGGTGGTGATGGTGGTCACCAGTGGAACCTGGAAC 3`

•complementar ao cDNA do gene da endostatina • 6 Histidinas •complementar ao vetor pSectag2/hygro A

- seqüência de bases complementar ao vetor pSectag2/hygro A (Peptídeo Sinalizador- SP)
- seqüência de bases complementar ao cDNA do gene da endostatina
- bases que codificam para 6 Histidinas

3.1.5.2. Fosforilação dos Oligonucleotídeos

A fosforilação dos oligonucleotídeos (10 pmoles/μl) foi realizada a 37°C por 45 minutos em tampão apropriado, na presença de 10 unidades da enzima T4 Polinucleotídeo Kinase e 1 mM de ATP. Após este período a enzima foi inativada incubando-se a 65°C por 10 minutos. Os oligonucleotídeos foram então diluídos com água destilada até a concentração de 5 pmoles/μL, para serem usados na mutagênese.

3.1.5.3. Preparação de DNA de fita simples (sfDNA)

Para a produção de DNA fita simples foi seguido o protocolo de Kunkel (1985). Bactérias *E.coli* RZ1032 (dut^-/ung^-) eletrocompetentes foram transformadas com o DNA plasmidial purificado do clone 14, contendo a ligação correta e o DNA de fita simples foi preparado a partir de fagemídeos que cresceram nesta cepa juntamente com o fago auxiliar (R408). Esta cepa é deficiente na enzima dUTPase (produto do gene dut), resultando no aumento intracelular de dUTP, que compete pelo dTTP na incorporação ao DNA. O uracil assim incorporado não é retirado devido à deficiência de uracil glicosilase (produto do gene ung), enzima esta que retira as bases uracila incorporadas ao DNA erroneamente trocando-as por timina. Cresceu-se uma cultura destas bactérias transformadas em meio YT (triptona 1,6%, extrato de leveduras 1% e NaCl 0,86M) acrescido de ampicilina (100μg/mL), à temperatura de 37°C, com agitação de 180 rotações por minuto, durante um período de 16 horas e 15 μL desta cultura foram adicionados em 1,5 mL de meio YT, cultivando-se nas mesmas condições até que a cultura atingiu uma densidade óptica (comprimento de onda de 600 nm e cubeta de 1 cm) de 0,2. Adicionou-se então 10 μl do fago auxiliar R408, incubando-se novamente à temperatura de 37°C, com agitação de 180 rotações por minuto, durante um período de 5 a 6 horas. Após este período a cultura foi centrifugada a

(10000g) por 5 minutos e ao sobrenadante transferido para novo tubo foram adicionados 200 µL de uma solução de PEG 8000 a 20% e NaCl 2,5 M, incubando-se por 15 minutos em temperatura ambiente. Após este período a cultura foi centrifugada a (10000 g) por 5 minutos e o pellet foi ressuspenso em 100 µL de TE. Essa solução contendo o DNA fita simples foi submetida à extração adicionando-se 50 µL de fenol (tamponado em Tris HCl pH 8) e centrifugando-se a (10000 g) por 5 minutos. Foram transferidos 90 µl da fase aquosa desta solução para um outro tubo onde foram adicionados 45 µl de acetato de amônia 7,5 M e 300 µl de etanol para precipitação do DNA, centrifugando-se a (10000 g) por 5 minutos. O pellet foi lavado com 300 µl de etanol 70% e novamente centrifugado nas mesmas condições. O pellet foi então seco em centrífuga liofilizadora, ressuspenso em 25 µl de TE e estocado a -20°C. Uma eletroforese em gel de agarose 0,6% corado com brometo de etídio foi realizada para confirmação da presença de sfDNA.

3.1.5.4. Reação de Mutagênese

A mutagênese sítio-dirigida é uma técnica utilizada para alterar seqüências específicas de nucleotídeos de segmentos de DNA clonados. No caso do procedimento por nós adotado (Kunkel, 1985), esta alteração foi obtida utilizando-se um oligonucleotídeo sintético cuja sequência continha a mutação de interesse. Na reação de mutagênese os moldes de DNA fitas simples contendo resíduos uracil hibridizam com a fita simples iniciadora (oligonucleotídeo). Após a hibridização do oligonucleotídeo que contém a sequência desejada com o DNA de fita simples contendo a sequência original, o iniciador é extendido com o fragmento de Klenow da DNA polimerase I e as extremidades são ligadas com T4 DNA ligase.

Foram feitas duas reações de mutagênese, uma para cada oligonucleotídeo diferente. Foram misturados e homogeneizados 5 µl (1 pmol)

de DNA de fita simples contendo resíduos uracila, 1 µl do oligonucleotídeo fosforilado (5 pmoles), 1 µl de tampão de anelamento (NaCl 500mM, Tris HCl 100mM pH 8, $MgCl_2$ 100mM e DTT 10mM) e 3 µl de água destilada. Esta reação foi incubada a 55°C por 5 minutos e resfriada por 10 minutos em temperatura ambiente. O molde de DNA foi copiado após a adição dos seguintes reagentes: 4 µl de cada um dos quatro nucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) em concentração de 2,5 mM cada, 1 µl de tampão de ligase (Tris HCl 660mM pH 7,5 , $MgCl_2$ 50mM e DTT 50mM), 1 µl de ATP 10 mM, 3,2 unidades de Klenow em 0,5 µl, 3,1 unidades da enzima T4 DNA ligase em 0,5 µl e 2 µl de água destilada. A mistura em reação foi incubada por duas horas em temperatura ambiente e 5 µl desta mistura foram utilizados para a transformação de bactérias *E. coli* HB2151 (dut^+/ung^+) eletrocompetentes, por eletroporação. Nestas cepas o molde contendo os resíduos uracil deve ter desvantagem em relação ao DNA que contém a mutação, e este molde original é inativo biologicamente.

As culturas de bactérias transformadas foram semeadas em placa L. B. ágar contendo ampicilina. Algumas das colônias que cresceram nas placas foram submetidas à purificação de DNA utilizando-se o kit QIAGEN. Os DNAs plasmidiais purificados foram digeridos e analizados para verificação da perda do sítio de restrição Hind III, presente no sítio de policlonagem do vetor pSecTag2, na região que se desejava retirar. Os clones que apresentaram a perda do sítio foram sequenciados para a confirmação da mutagênese.

3.2. Transformação, seleção e amplificação das células eucariotas

3.2.1. Determinação da concentração mínima letal de Higromicina para as células LM (TK-)

Os fibroblastos murinos designados LM (TK-) foram adquiridos da ATCC (CCL-1.3) e são provenientes de músculo de camundongo da linhagem C3H. Estas células foram transportadas congeladas em gelo seco. As células foram descongeladas, transferidas para uma garrafa de cultura celular e foram mantidas em meio D10 (DMEM → Dulbecco's modified Eagle's medium contendo 4,5g/L de glicose, 110 mg/L de piruvato de sódio e suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 μg/mL de streptomicina), segundo as recomendações da ATCC. Os fibroblastos foram cultivados a 37°C, em atmosfera úmida, contendo 5% de CO_2. Para a subcultura as células foram diluídas 1:10 após serem destacadas da garrafa utilizando-se solução de tripsina (tripsina 0,05%, EDTA 0,02% e glicose 0,1%).

A fim de se determinar a concentração de higromicina mínima letal para as células, num período entre 10 e 15 dias, foi realizado um experimento, no qual foram semeadas 5.000 células em cada poço de 1,96 cm^2, de uma placa de cultura celular de 24 poços. O experimento foi realizado em triplicata e posteriormente repetido para confirmação do resultado. Foram utilizadas as seguintes concentrações de higromicina: 700 μg/mL, 600 μg/mL, 500 μg/mL, 400 μg/mL, 300 μg/mL e 200 μg/mL, além do controle (meio D10 sem higromicina). No primeiro dia de experimento as células foram semeadas nos poços com meio D10 para adesão das células. Após 24 horas o meio de cultura foi trocado pelas soluções de D10 contendo higromicina nas diferentes concentrações. As células em cultura foram observadas até o 15° dia, trocando-se os meios com e sem higromicina a cada 3 dias.

3.2.2. Transfecção das células utilizando o método de precipitação do DNA com Fosfato de Cálcio

O processo de transfecção possibilita a entrada de DNA exógeno na célula eucariota através da abertura de canais na membrana celular pela ação

de substâncias químicas, de forma que esse DNA irá se integrar ao DNA genômico. A transfecção com fosfato de cálcio foi escolhida preferencialmente por ser a que melhor se adaptou às nossas necessidades, tratando-se de um método de transfecção estável em células eucariotas, que é comumente utilizado (Current Protocols in Molecular Biology, 1988). Ao misturar-se lentamente sob borbulhamento, a solução de DNA à solução tampão HEPES-PO_4, forma-se um precipitado que quando em contato com as células deve se aderir à superfície celular. Desta forma foi realizada a transfecção das células LM (TK-) com os DNAs plasmidiais dos clones que se apresentaram corretos após o sequenciamento: 11 $\Rightarrow$ $(His)_6$-Met-endostatina e 16 $\Rightarrow$ endostatina. A fim de se determinar os parâmetros ideais para a transfecção foram feitas, previamente, seis transfecções com uma mesma amostra (clone 11) diferenciando-se os parâmetros de tempo, quantidade de DNA e possibilidade de choque com solução de glicerol 10%, os quais são críticos neste processo de transfecção. Para a realização da transfecção foram semeadas 10^6 células por placa de cultura celular de 100 cm de diâmetro, no dia anterior ao experimento. Estas células foram cultivadas em meio D10, incubadas em estufa a 37°C, em atmosfera úmida, contendo 5% de CO_2. Para a reação foram utilizados 100 μL de $CaCl_2$ 2,5 M, 1mL de tampão Hepes-fosfato (Hepes 50 mM, Na_2HPO_4 1,5 mM e NaCl 280mM) e 10, 25 ou 30 μg de DNA purificado e quantificado em espectrofotômetro (1 $A_{260\ nm}$= 50 μg DNA fita dupla/ml). A reação foi realizada em tubo cônico de 15 mL e a solução de $CaCl_2$ contendo o DNA foi adicionada, gotejando-se lentamente ao tampão HEPES-fosfato sob borbulhamento constante de ar. A solução foi então incubada por 30 minutos em temperatura ambiente para a formação dos microprecipitados de fosfato de cálcio/DNA e posteriormente distribuída sobre as células nas placas. Após 6 ou 16 horas de incubação, o meio das placas foi aspirado e as placas foram lavadas três vezes com PBS (tampão fosfato-

salina contendo NaCl 150 mM e Na_3 PO_4 10 mM pH 7,2), sendo em seguida mantidas em meio D2 (DMEM contendo 4,5g/L de glicose, 110 mg/L de piruvato de sódio e suplementado com 2% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 μg/mL de streptomicina) durante dois dias. Algumas placas foram submetidas ainda ao choque com glicerol previamente a troca do meio. Foram adicionados 10 mL de solução de glicerol 10% estéril nas placas, após ser aspirada a solução de DNA - fosfato de cálcio e incubou-se por 3 minutos em temperatura ambiente, seguindo com o procedimento de lavagem e troca do meio já descritos. Após os dois dias de incubação, as células foram tripsinizadas e semeadas em novas placas de 10 cm de diâmetro, para realização do processo de seleção. Com o intuito de se obter um grande número de transformantes isolados foram semeadas 5×10^3, 10^4 e 5×10^4 células por placa. A seleção dos transformantes foi realizada em meio seletivo D10 contendo 600 μg/mL de higromicina por um período de 15 dias trocando-se o meio a cada 3 dias.

O teste de eficiência de transfecção foi finalizado fixando-se e corando os clones resistentes à seleção adicionando-se 8 mL de solução de Rodamina B a 2% em formol a 4% nas placas. Incubou-se então em temperatura ambiente durante 30 minutos e em seguida a solução foi aspirada e as placas lavadas com água destilada para retirada do excesso do corante. As colônias de cada placa foram então contadas para determinação da eficiência de transfecção nas diferentes condições.

3.2.3. Isolamento e amplificação dos clones positivos

Após a seleção, os clones foram isolados, com o auxílio de alças plásticas estéreis, raspando-se as colônias delicadamente e transferindo as células para poços isolados em placas de 12 poços, agitando-se a alça no meio de cultura D10 contendo a mesma concentração de higromicina utilizada na

seleção previamente colocado nos poços, de forma que as células se soltassem. As células foram propagadas até atingir a semi-confluência e transferidas para placas de 6 poços e garrafas de 75 cm^2 respectivamente, onde foram mantidas para amplificação.

3.2.4. Preparo e coleta do meio condicionado

Para o preparo do meio condicionado de 24 horas, 2×10^5 células de cada um dos clones isolados foram semeadas em meio D10 em placas de 6 poços. Após 24 horas o meio destas células foi trocado por meio D10 fresco e após 24 horas o meio foi coletado, centrifugado a 4000 g e o sobrenadante foi estocado a -20°C. As células foram submetidas à tripsinização e contadas em câmara de Neubauer.

3.3. Caracterização e Quantificação da Endostatina recombinante

3.3.1. Western Blotting

3.3.1.1. SDS - PAGE

Foi realizada a eletroforese em gel de separação a 12% e de empilhamento a 3% de poliacrilamida, em condições não redutoras (Laemmli, 1970). Foram adicionados 5 μL de tampão de amostra não redutor (Tris-HCl 50mM pH 6,8, DTT 25mM, glicerol 10%, SDS 1% e azul de bromofenol 0,08mg/mL) em 20 μL das amostras de meio condicionado dos clones a serem testados. Como controle negativo utilizou-se meio condicionado de uma cultura de células LM (TK-) não transfectadas. As amostras foram então fervidas a 65°C por 5 minutos e aplicadas no gel. Foi aplicado também um marcador de peso molecular e a corrida, foi realizada a 90 volts no período necessário para o corante azul de bromofenol contido nas amostras chegar no final do gel de separação.

3.3.1.2. Transferência

A transferência das proteínas, do gel para a membrana de nitrocelulose, foi realizada por eletroeluição do gel em cuba de transferência, com eletrodos de grafite, utilizando-se folhas de papel de filtro 3MM embebidos em tampão de transferência (Glicina 39mM, Tris 48mM, SDS 0,0375%, Metanol 20%) em contato direto com os eletrodos, membrana de nitrocelulose sobre o papel de filtro próximo ao pólo positivo e o gel entre a membrana e o papel de filtro próximo ao pólo negativo. A corrente foi fixada de acordo com a área do gel (0,85mA por cm^2) para a transferência total da endostatina.

3.3.1.3. Imunorreação

Após a lavagem da membrana com PBS contendo 5% de leite em pó desnatado, a mesma foi incubada com anticorpo policlonal anti-endostatina murina (Chemicon, Temecula, CA, EUA) diluído (1:150) na mesma solução de PBS contendo 5% de leite, por um período de 24 horas. Em seguida a membrana foi lavada 2 vezes na solução de PBS contendo 5% de leite e incubada com proteína A* marcada com ^{125}I (4×10^5 cpm/mL) em solução de PBS contendo 5% de leite durante 1 hora. Após a incubação, a mesma foi lavada 4 vezes com solução de PBS contendo 5% de leite e 2 vezes com PBS contendo 0,01% de tween 20. A membrana após secagem foi utilizada para autoradiografia.

3.3.2. Imunoensaio (Elisa – Kit Accucyte)

A quantificação da endostatina recombinante no meio condicionado foi feita utilizando-se o kit de ELISA para quantificação de endostatina

murina Accucyte Mouse Endostatin (Cytimmune Sciences Inc., College Park, MD, EUA) seguindo o protocolo. Este ensaio emprega a técnica quantitativa de enzimaimunoensaio com duplo anticorpo, sendo o 2° anticorpo anti-IgG de coelho (produzido em cabra) pré-revestido na placa que tem a função de capturar um complexo específico que consiste de: endostatina biotinilada, amostra ou padrão e anticorpo anti-endostatina conjugado. A endostatina biotinilada (ligante competitivo) e a amostra ou o padrão competem pelos sítios de ligação do anticorpo específico anti-endostatina. Portanto, quanto maior a quantidade de endostatina nas amostras menor a quantidade de endostatina biotinilada capturada pelo anticorpo. O ensaio é lido em leitor de ELISA baseado na capacidade do conjugado streptavidina alcalina fosfatase de desenvolver coloração quando em contato com o agente cromogênico. A quantidade de endostatina detectada em cada amostra é comparada com uma curva padrão de endostatina que demonstra uma relação inversa entre a densidade óptica (D.O.) e a concentração da proteína.

O ensaio foi realizado em duplicata. As amostras foram diluídas previamente em tubos de microcentrífuga onde foram adicionados 160 μL do diluente #1, 80 μL do diluente #2 e 80 μL do meio condicionado referente a cada clone testado. Após vortexar as amostras, foram adicionados 100 μL de cada preparação de amostra nos poços pré-determinados na placa de 96 poços. Também foram aplicados 100μL dos padrões de endostatina #0-6 nos poços pré-determinados. Foram então aplicados 25 μL de conjugado de endostatina em cada poço, e imediatamente após este passo, adicionou-se 25 μL de anticorpo policlonal anti-endostatina murina nos poços. A placa foi então selada com selador de acetato para prevenir a evaporação e incubada em temperatura ambiente por um período de 3 horas. Após este período foi realizada a lavagem da placa, descartando-se as amostras dos poços e colocando-se a placa invertida sobre papéis absorventes limpos até que os resíduos fossem

completamente absorvidos pelo papel. Pipetou-se então 250 μL do tampão de lavagem nos poços descartando-o em seguida, e colocando-se novamente a placa invertida sobre papéis absorventes limpos até que os resíduos fossem completamente absorvidos pelo papel. Este passo foi repetido quatro vezes e em seguida foram adicionados 50 μL de Streptavidina Phosphatase Alcalina em cada poço. A placa foi novamente selada e incubada em temperatura ambiente por um período de 30 minutos. Após este período foi realizada novamente a lavagem da placa, como descrito anteriormente, e foram adicionados 200 μL de solução reagente de cor em cada poço. A geração de cor foi então monitorada constantemente em leitor de ELISA lendo-se a 490 nm até que o padrão de endostatina Dose zero atingisse uma D.O. de 1.6-1.8.

3.4. Análise da atividade biológica da endostatina recombinante

3.4.1. Ensaio de Proliferação das Células Endoteliais

A avaliação da atividade biológica da endostatina foi realizada utilizando-se um bioensaio baseado na habilidade da endostatina em inibir o crescimento das células endoteliais (Dhanabal e cols., 1999a). O ensaio foi realizado pela determinação da incorporação de ^{3}H-timidina pelas células em cultura, indicando síntese de DNA, ou seja, a divisão celular. Desta forma foi avaliada a atividade inibitória da endostatina recombinante no meio condicionado dos clones selecionados sobre a divisão das células endoteliais. A linhagem de células C-PAE (célula endotelial de artéria do pulmão de bezerro) foi adquirida da ATCC (CCL-209). As células foram cultivadas em meio MEM 10 (meio MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 μg/mL de streptomicina), segundo as recomendações da ATCC. Para a realização do ensaio foram semeadas 5×10^3 células ressuspensas em 200 μL de meio MEM 2 (meio MEM suplementado com 2% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100

μg/mL de streptomicina) em placas de 96 poços. Após um período de 24 horas o meio foi trocado por 170 μl de meio MEM 1 (meio MEM suplementado com 1% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 μg/mL de streptomicina), bFGF (3ng/ml) e 1μCi de ^{3}H-timidina, adicionando-se simultaneamente 30 μl de diferentes diluições do meio condicionado. Como controle positivo foram aplicadas amostras de endostatina purificada obtida de *E. coli* transformada com pETKH1 nas diluições 1:10, 1:100 e 1: 1000 e como controle negativo aplicou-se meio condicionado de uma cultura de células LM(TK-) não transfectadas. Após um período de 24 horas o meio foi aspirado, as células foram lavadas três vezes com PBS e então solubilizadas pela adição de 100 μl de NaOH 1,5N por poço, incubando-se 30 minutos a 37°C. O conteúdo dos poços foi transferido para um filtro, e a radioatividade incorporada pelo DNA foi estimada pela contagem, em contador de partículas ß com líquido de cintilação.

4. RESULTADOS

4.1. Construção do vetor de expressão contendo o cDNA do gene da endostatina murina

4.1.1. Obtenção do fragmento de DNA contendo o gene da endostatina

O plasmídeo pETKH-1 digerido com a enzima NheI, seguido do tratamento com o fragmento de Klenow da DNA polimerase I e da digestão com a enzima KpnI gerou dois fragmentos quando submetido à eletroforese em gel de agarose: o fragmento do vetor com 5,7 Kb e o do inserto com 600 pb contendo o cDNA do gene da endostatina, que codifica 184 aminoácidos correspondendo as posições 1132 a 1315 do colágeno XVIII (Figura 2), conforme o esperado.

4.1.2. Obtenção do pSecTag2 linearizado

O plasmídeo pSecTag2, digerido com as enzimas Kpn I e Eco RV, gerou um fragmento de 5,7 Kb quando submetido à eletroforese em gel de agarose (Figura 2), conforme o esperado segundo as informações do fabricante (Invitrogen).

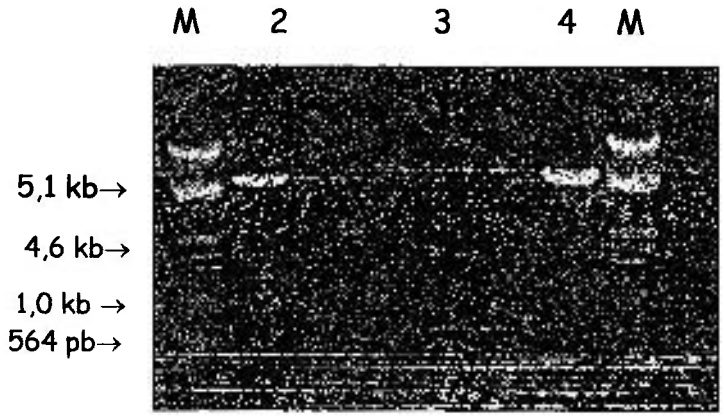


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose 1%. M (Marcador de DNA λ digerido com Eco RI e Hind III), 2 (fragmentos de 5,7 kb e 600 pb resultantes da digestão do plasmídeo pETKH-1), 3 (fragmento de 600 pb referente ao gene da endostatina purificado), 4 (fragmento de 5,7 kb correspondente ao vetor pSecTag2 linearizado).

4.1.3. Reação de Ligação do gene da Endostatina murina ao vetor de expressão pSecTag2/Hygro A

As bactérias DH5α foram submetidas à eletroporação com o produto da reação de ligação (Figura 3), seguida de sua cultura em meio seletivo com antibiótico após a eletroporação, gerando resultados positivos de crescimento de colônias resistentes à ampicilina. Foram escolhidas 18 colônias isoladas e realizadas purificações dos DNAs e posterior digestão com enzimas de restrição que flanqueiam o inserto a ser clonado.

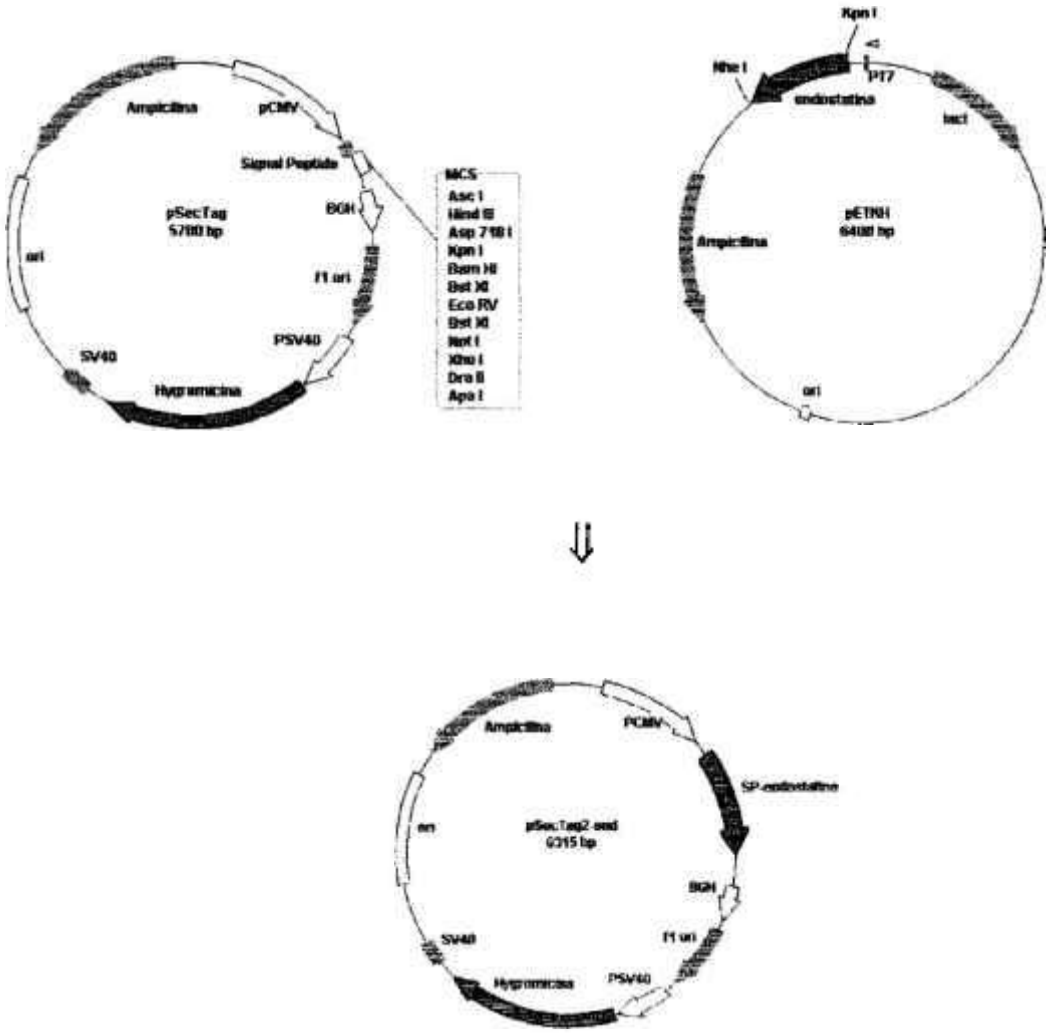


Figura 3: Construção do vetor de expressão pSecTag2 contendo o gene da endostatina (produto da reação de ligação).

Para confirmar a reação de ligação utilizamos as enzimas Xho I e Kpn I que flanqueiam o DNA da endostatina no vetor pSecTag 2 contendo o inserto desejado. Como pode ser observado na figura 4, a análise dos fragmentos, obtidos pelas digestões dos DNAs purificados e subseqüente eletroforese em gel de agarose a 1%, revelou que para o clone 14 obteve-se um fragmento de aproximadamente 600 pb, que confere com o tamanho do inserto a ser clonado, além de um fragmento de aproximadamente 5.7 kb correspondente ao tamanho do vetor pSecTag2.

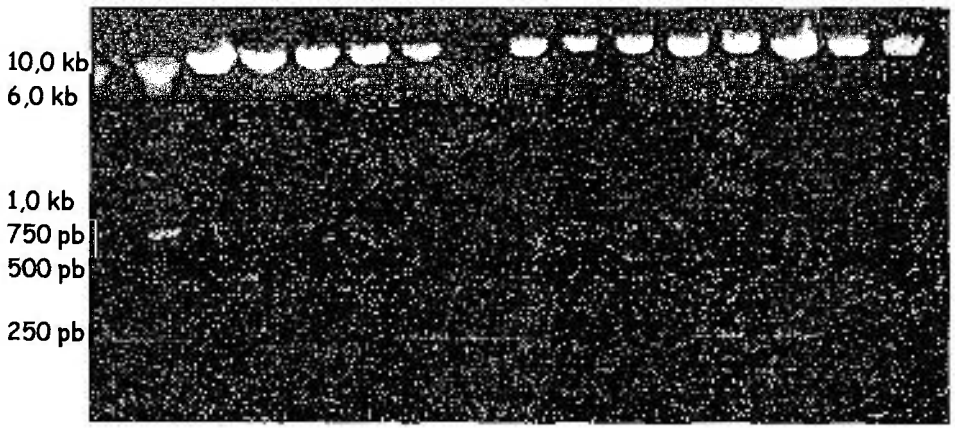


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose 1%. Análise de restrição dos diversos clones obtidos da reação de ligação. M (Marcador de DNA em pares de base - Promega G7542), 1, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18 e 19 (diferentes clones testados). Pode-se observar para a amostra 14 o fragmento da endostatina (600 pb) e o fragmento do vetor pSecTag2 (5,7kb).

Foi também realizada a digestão do DNA do clone 14 com as enzimas Pst I (presente no gene da endostatina) e Xho I a fim de confirmar a orientação do gene da endostatina no vetor de expressão (dado não

apresentado), tendo sido obtido o resultado que confirma a orientação correta (bandas de 440 pb e 5,9 Kb).

A confirmação da presença do inserto também foi realizada por sequenciamento de DNA, o qual se fez necessário para que pudéssemos conhecer a sequência de nucleotídeos a 5' do cDNA da endostatina, necessária para o procedimento de mutagênese, já que esta seqüência não foi fornecida no mapa do vetor pETKH-1. Os resultados obtidos foram submetidos a análise utilizando-se o programa BLAST. O sequenciamento do clone 14, segundo a análise, apresentou uma região com 100% de homologia com o gene da endostatina murina, confirmando assim o sucesso da reação de ligação e sendo, por este motivo, o clone escolhido para darmos continuidade ao nosso trabalho.

4.1.4. Mutagênese

4.1.4.1. Reação de Mutagênese

A finalidade da mutagênese foi a de colocar o gene da endostatina, previamente clonado no vetor de expressão, em fase de leitura com o final do peptídeo sinalizador presente no vetor de expressão, de maneira que após a tradução da proteína, houvesse a clivagem da mesma liberando a endostatina (oligonucleotídeo 1) ou 6His-Met-endostatina (oligonucleotídeo 2). Seguimos diferentes estratégias para obtenção de clones expressando endostatina, na tentativa de obtermos clones com altos níveis de expressão da proteína. Além disso, a fusão de endostatina com 6 resíduos de histidina pode ser útil tanto para a purificação da proteína por cromatografia de metais imobilizados quanto para sua caracterização e quantificação, pela utilização de anticorpos anti-histidina, disponíveis no mercado. As reações de mutagênese realizadas com os oligonucleotídeos 1 e 2 resultaram em clones que pela análise do DNA plasmídico puro com

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP-IPEN

enzimas de restrição adequadas (Hind III e Xho I) apresentaram o padrão de bandas desejado e foram enviados para sequenciamento em uma direção (5'-3').

As seqüências de nucleotídeos obtidas no sequenciamento foram alinhados com as sequências de DNAs esperadas e, a partir do alinhamento dos sequenciamentos dos clones 16 (endostatina) (Figura 5) e 11 (6His-Met-endostatina) (Figura 6) ficou demonstrado que a reação de mutagênese ocorreu com sucesso para estes dois oligonucleotídeos e o gene da endostatina ficou em fase de leitura com o peptídeo sinalizador do vetor de expressão, sendo estes clones os escolhidos para dar continuidade com o processo de transfecção.

```
X - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - A T G G A G A C A G A C A C A C T C C T G C T A T G G G T A C T G C T G C T C T G G G T T C
                    10                  20                  30                  40                  50                  60                  70
Seqüência 1 - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - A T G G A G A C A G A C A C A C T C C T G C T A T G G G T A C T G C T G C T C T G G G T T C   46
Seqüência 2 C C C T T N A N N A N N C C T N T A N C C A C C A T G G A G A C A G A C A C A C T C C T G C T A T G G G T A C T G C T G C T C T G G G T T C   70
Seqüência 3 T - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - G G A C A G A C A N A C T C C T G C T A T G G G T A C T G C T G C T C T G G G T T T   43
```

```
C A G G T T - C C A C T G G T C A T A C T C A T C A G G A C - T T T C A - G C C A G T G C T C C A C C - - T G G T G G C A C T G A A C A C C
                    80                  90                  100                 110                 120                 130                 140
Seqüência 1 C A G G T T - C C A C T G G T C A T A C T C A T C A G G A C - T T T C A - G C C A G T G C T C C A C C - - T G G T G G C A C T G A A [illegible]   111
Seqüência 2 C A G G T T - C C A C T G G T C A T A C T C A T C A G G A C - T T T C A - G C C A G T G C T C C A C C - - T G G T G G C A C T G A A C A C C   135
Seqüência 3 T N N G T T T C C A C T G G T T A T A C T C A T C A G G A C A T T T C A C A C C A N T G C T C C A C A C A T G G T G G N A C T G A A C A C C   113
```

```
C C C C T G T - C T G G A G G C A T G C G T G G T A T C C G T G G A G C A G A T T T C C A G T G C T T C C A G C A A G C C C G A G C C G T G
                    150                 160                 170                 180                 190                 200                 210
Seqüência 1 [illegible] A G G C A T G C G T G G T A [illegible] G C A G A T T T C C A G T G C T T C C A G C A A G C C C G [illegible]   180
Seqüência 2 C C C C T G T - C T G G A G G C A T G C G T G G T A T C C G T G G A G C A G A T T T C C A G T G C T T C C A G C A A G C C C G A G C C G T G   204
Seqüência 3 C C C C T G T T C T G G A G G C A T G C G T G G T A T C C G N G G A G C A G A T T T C C A G T G C T T C C A G C A A G C C C G A G C C G T G   183
```

```
G G G C T G T C - G G G C A C C T T C C G G G C T T T C C T G T C C T C T A G G C T G C A G G A T C T C T A T A G C A T C G T - G C G C C G
                    220                 230                 240                 250                 260                 270                 280
Seqüência 1 [illegible]   248
Seqüência 2 G G G C T G T C - G G G C A C C T T C C G G G C T T T C C T G T C C T C T A G G C T G C A G G A T C T C T A T A G C A T C G T - G C G C C G   272
Seqüência 3 G G G C T G T C A G G G C A C C T T C C G G G C T T T C C T G T C C T C T A G G C T G G N G G A T C T C T A T A G C A T C N N A G C G C C G   253
```

```
T G C T G A C C G G G G G T C T G T G C C C A T C G T C A A C C T G A A G G A C G A G G T G C T A T C T C C C A G C T G G G A C T C C C T G
                    290                 300                 310                 320                 330                 340                 350
Seqüência 1 [illegible]   339
Seqüência 2 T G C T G A C C G G G G G T C T G T G C C C A T C G T C A A C C T G A A G G A C G A G G T G C T A T C T C C C A G C T G G G A C T C C C T G   335
Seqüência 3 T G C T G A C C G G G G G T C T G N G C C C A T N G T N A A C C T G A A G G A C G A G G T G C T A T C T C C C A G C T G G G A C T C C C T G   347
```

```
T T T T C T G G C T C C C A G G G T C A A C T G C A A C C C G G G G C C C G C A T C T T T T C T T T T G A C G G C A G A G A T G T C C T G A
                    360                 370                 380                 390                 400                 410                 420
Seqüência 1 [illegible]   388
Seqüência 2 T T T T C T G G C T C C C A G G G T C A A C T G C A A C C C G G G G C C C G C A T C T T T T C T T T T G A C G G C A G A G A T G T C C T G A   412
Seqüência 3 N N T T C T G G C T C C C A G N G T C A A C T G C A A C C C G G G G C C C N C A T T T T T N N T T T T G A C G G C A G A N A T G T C C T G A   393
```

```
G A C A C C C A G C C T N G C C G C A G A A X A G C G T A T G G C A C G G C T C G G A C C C C A X T G G G C G G A G G C T G A T G G A G A X
                    430                 440                 450                 460                 470                 480                 490
Seqüência 1 [illegible] T G G C C G C A G A A [illegible] C C C C A G T G G G C G G - G G C T G A T G G A G A [illegible]   458
Seqüência 2 G A C A C C - A A C C T G N C C G C A G A A N A G C G T A T G G C A C G G C T C G G A C C C C A N T G G G C G G A G G C T G A T G G A G A N   481
Seqüência 3 N A C A C C C A G T C N G G C C G C N T A A C A G C G N A T G G C A C N G T T T - - - - - - - - - - - - - - C G G N A C C C C A C N I G G G -   450
```

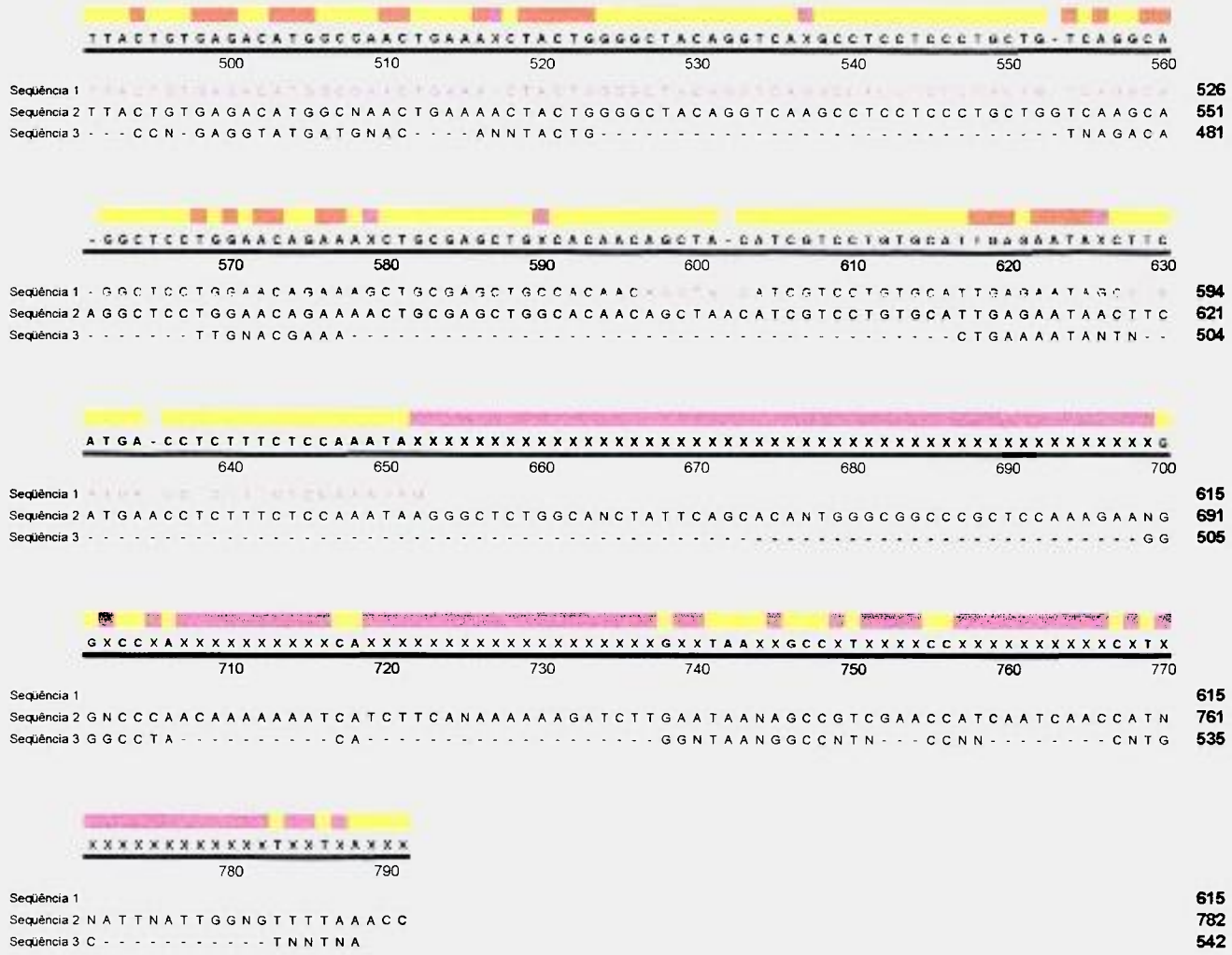
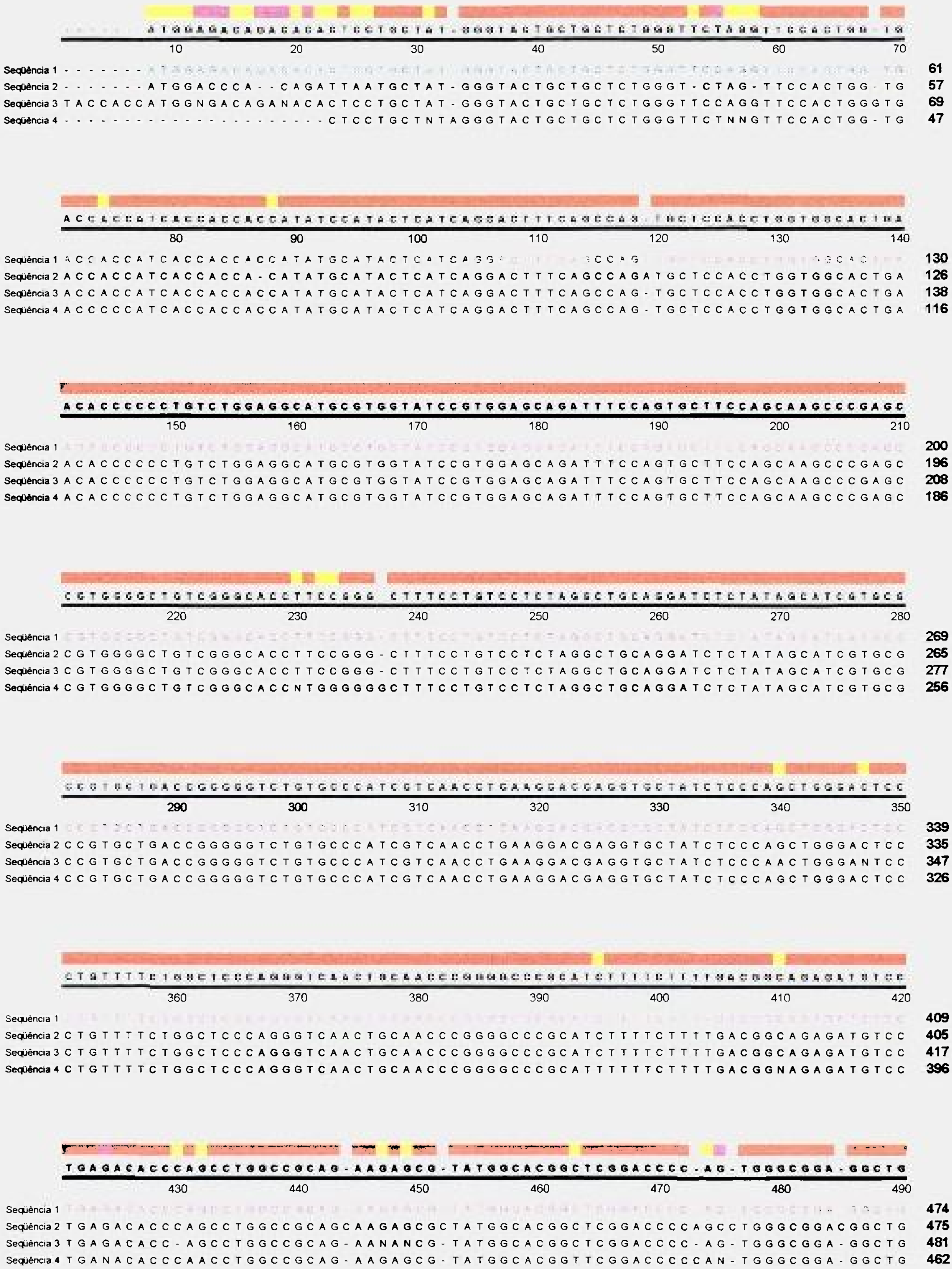


Figura 5: Alinhamento dos sequenciamentos realizados para confirmação da mutagênese.
Sequência 1 → Sequência Esperada
Sequência 2 e 3 → Resultados obtidos dos sequenciamentos


10 20 30 40 50 60 70
Sequência 1 61
Sequência 2 -------ATGGACCCA--CAGATTAATGCTAT-GGGTACTGCTGCTCTGGGT-CTAG-TTCCACTGG-TG 57
Sequência 3 TACCACCATGGNGACAGANACACTCCTGCTAT-GGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGGTG 69
Sequência 4 ---------------------CTCCTGCTNTAGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCTNNGTTCCACTGG-TG 47
80 90 100 110 120 130 140
Sequência 1 130
Sequência 2 ACCACCATCACCACCA-CATATGCATACTCATCAGGACTTTCAGCCAGATGCTCCACCTGGTGGCACTGA 126
Sequência 3 ACCACCATCACCACCACCATATGCATACTCATCAGGACTTTCAGCCAG-TGCTCCACCTGGTGGCACTGA 138
Sequência 4 ACCCCCATCACCACCACCATATGCATACTCATCAGGACTTTCAGCCAG-TGCTCCACCTGGTGGCACTGA 116
ACACCCCCCTGTCTGGAGGCATGCGTGGTATCCGTGGAGCAGATTTCCAGTGCTTCCAGCAAGCCCGAGC
150 160 170 180 190 200 210
Sequência 1 200
Sequência 2 ACACCCCCCTGTCTGGAGGCATGCGTGGTATCCGTGGAGCAGATTTCCAGTGCTTCCAGCAAGCCCGAGC 196
Sequência 3 ACACCCCCCTGTCTGGAGGCATGCGTGGTATCCGTGGAGCAGATTTCCAGTGCTTCCAGCAAGCCCGAGC 208
Sequência 4 ACACCCCCCTGTCTGGAGGCATGCGTGGTATCCGTGGAGCAGATTTCCAGTGCTTCCAGCAAGCCCGAGC 186
CGTGGGGCTGTCGGGCACCTTCCGGG CTTTCCTGTCCTCTAGGCTGCAGGATCTCTATAGCATCGTGCG
220 230 240 250 260 270 280
Sequência 1 269
Sequência 2 CGTGGGGCTGTCGGGCACCTTCCGGG-CTTTCCTGTCCTCTAGGCTGCAGGATCTCTATAGCATCGTGCG 265
Sequência 3 CGTGGGGCTGTCGGGCACCTTCCGGG-CTTTCCTGTCCTCTAGGCTGCAGGATCTCTATAGCATCGTGCG 277
Sequência 4 CGTGGGGCTGTCGGGCACCNTGGGGGGCTTTCCTGTCCTCTAGGCTGCAGGATCTCTATAGCATCGTGCG 256
290 300 310 320 330 340 350
Sequência 1 339
Sequência 2 CCGTGCTGACCGGGGGTCTGTGCCCATCGTCAACCTGAAGGACGAGGTGCTATCTCCCAGCTGGGACTCC 335
Sequência 3 CCGTGCTGACCGGGGGTCTGTGCCCATCGTCAACCTGAAGGACGAGGTGCTATCTCCCAACTGGGANTCC 347
Sequência 4 CCGTGCTGACCGGGGGTCTGTGCCCATCGTCAACCTGAAGGACGAGGTGCTATCTCCCAGCTGGGACTCC 326
360 370 380 390 400 410 420
Sequência 1 409
Sequência 2 CTGTTTTCTGGCTCCCAGGGTCAACTGCAACCCGGGGCCCGCATCTTTTCTTTTGACGGCAGAGATGTCC 405
Sequência 3 CTGTTTTCTGGCTCCCAGGGTCAACTGCAACCCGGGGCCCGCATCTTTTCTTTTGACGGCAGAGATGTCC 417
Sequência 4 CTGTTTTCTGGCTCCCAGGGTCAACTGCAACCCGGGGCCCGCATTTTTTTCTTTTGACGGNAGAGATGTCC 396
TGAGACACCCAGCCTGGCCGCAG-AAGAGCG-TATGGCACGGCTCGGACCCC-AG-TGGGCGGA-GGCTG
430 440 450 460 470 480 490
Sequência 1 474
Sequência 2 TGAGACACCCAGCCTGGCCGCAGCAAGAGCGCTATGGCACGGCTCGGACCCCAGCCTGGGCGGACGGCTG 475
Sequência 3 TGAGACACC-AGCCTGGCCGCAG-AANANCG-TATGGCACGGCTCGGACCCC-AG-TGGGCGGA-GGCTG 481
Sequência 4 TGANACACCCAACCTGGCCGCAG-AAGAGCG-TATGGCACGGTTCGGACCCCAN-TGGGCGGA-GGCTG 462

```
ATGGAGAGTTACTGTGAGACATGGCGAACTGAAACTACTGGGGCTA-CAGGTCAGGCCTCCTCCCTGCTG
                500       510       520       530       540       550       560
Seqüência 1 [illegible]                                                                543
Seqüência 2 ATGGAGAGTTACTGTGAGACATGGCGAACTGAAACTACTGGGGCTA-CAGGTCAGGCCTCCTCCCTGCTG   544
Seqüência 3 ATGGANANTTACTGTGAGACATGGCGAACTGAAACTACTGGGGCTAACAGGTCAANCCTCCTCCCTGCTG   551
Seqüência 4 ATGNANAGTTACTGTGAGACATGGCGAACTGAAACTACNTG                                503

TCAGGCAXG-GCTCCTGGAA-ACAXAAA-AGCTGC-GAGCTGCCACAACA-GCTA-CATCGTCCTGTGGC
                570       580       590       600       610       620       630
Seqüência 1 [illegible]                                                              603
Seqüência 2 TCAGGCACGCGCTCCTGGAACACGCACACAGCTGCCGAGCTGCCACANCA-GCTA-CATCGTCCTGTTGC   612
Seqüência 3 TCAGGCAAN-GCTCCTGNAA-ACAAAAA-AGCTGN-NAGCTGNCACAAAAAGCTAACATCGTCCTGTGGC   617
Seqüência 4                                                                          503

ATTXGAGAATAXCTTTCAT--GACCTCTTTCTXCCXAAATAXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
                640       650       660       670       680       690       700
Seqüência 1 [illegible]                                                              639
Seqüência 2 CTNGCCGAATNACCTTCCT--GACCTCCTTCTCC---ANTANGG-CCTCTGC                     658
Seqüência 3 ATTTGAGAATANNTTTCATTGAACCTCTTTCTTCCNAAATAANGGCCTCTGNCAAGCTTATTCCAACNAC  687
Seqüência 4                                                                          503

XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
                710       720       730       740       750       760       770
Seqüência 1                                                                          639
Seqüência 2                                                                          658
Seqüência 3 NAGTGGGCGGGCCCGCTTCNAANAAGGGGCCCAAACAAAAAAATTCATCCTCAAAAAAAAGGATTNTGAA  757
Seqüência 4                                                                          503

XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
                780       790
Seqüência 1                                                                          639
Seqüência 2                                                                          658
Seqüência 3 ATTATNNGCCCGNCCGAACCAATCAA                                               783
Seqüência 4                                                                          503
```

bases correspondentes ao peptídeo sinalizador

bases correspondentes ao gene da endostatina

Figura 6: Alinhamento dos sequenciamentos realizados para confirmação da mutagênese.
Seqüência 1 → Seqüência Esperada
Seqüência 2, 3 e 4 → Resultados obtidos dos sequenciamentos

4.2 Transformação, seleção e amplificação das células eucariotas

4.2.1 Determinação da concentração mínima letal de Higromicina para as células LM (TK-)

Foi realizado um experimento com higromicina, utilizando-se diversas concentrações a fim de se determinar a dose mínima letal para os fibroblastos LM(TK-). O experimento foi realizado em duplicata e posteriormente repetido confirmando, dessa forma, os resultados obtidos. As concentrações utilizadas no teste foram: 700 μg/mL, 600 μg/mL, 500 μg/mL, 400 μg/mL, 300 μg/mL, 200 μg/mL além do controle. Nas concentrações de 700 μg/mL e 600 μg/mL foram observadas poucas células vivas no 10° dia de experimento e no 15° dia de experimento não haviam mais células vivas. Nas concentrações de 500 μg/mL e 400 μg/mL foram observadas células vivas até o 15° dia de experimento e estas já tinham ultrapassado a semi-confluência. Nas concentrações de 300 μg/mL e 200 μg/mL as células atingiram a confluência no 6° dia de experimento, assim como no controle negativo (células na ausência de higromicina). Baseado nestes resultados, a concentração de higromicina utilizada para a seleção dos fibroblastos murinos após a transfecção, ou seja, a concentração mínima letal de higromicina para as células foi de 600 μg/mL.

4.2.2. Transfecção das células utilizando o método de precipitação do DNA com Fosfato de Cálcio

Com o intuito de se otimizar a transfecção, que tem um rendimento muito baixo (em torno de 0,1 a 1%), foi feito um teste diferenciando-se os parâmetros críticos para a transfecção. Foram feitas seis transfecções com uma mesma amostra (clone 11), diferenciando-se os parâmetros de tempo, quantidade de DNA e possibilidade de choque com

solução de glicerol 10%. Para determinar a melhor condição de transfecção, as placas foram fixadas e coradas utilizando-se Rodamina B a 2% em formol a 4% após a seleção dos clones resistentes para verificação da eficiência de formação de colônia (EFC) nas diferentes condições. De acordo com os resultados obtidos no teste de EFC (figura 7), a condição que apresentou uma melhor eficiência da transfecção (0,75%) foi a condição com maior quantidade de DNA (30 μg) e menor tempo de incubação (6 horas), sem o choque com solução de glicerol 10% (Tabela 1).

Baseando-se nestes resultados foi realizada a transfecção com os clones 16 (endostatina) e 11 (6His-Met-endostatina) utilizando-se 30 μg de DNA purificado e incubando-se por um período de 6 horas.

Tabela I: Diferentes parâmetros utilizados na otimização da técnica de transfecção.

Condições	Quantidade de DNA	Tempo de incubação (horas)	Presença de Glicerol	Eficiência de transfecção (%)
1	10 μg	6 horas	-	0,18%
2	10 μg	16 horas	-	0,19%
3	30 μg	6 horas	-	0,75%
4	30 μg	16 horas	-	0,06%
5	10 μg	6 horas	+	0,02%
6	10 μg	16 horas	+	0,13%

Figura 7: Teste de eficiência de formação de colônia com os diferentes parâmetros testados na transfecção (Referentes aos números da Tabela I). 10^6 células foram transfectadas e os clones resistentes à higromicina (600μg) após a seleção, foram fixados e corados utilizando-se Rodamina B a 2% em formol a 4%.

4.2.3. Isolamento e amplificação dos clones positivos

O método de isolamento dos clones positivos, após a seleção, utilizando-se alças plásticas estéreis, foi satisfatório visto que todos os clones isolados foram cultivados até atingirem a semi-confluência, demonstrando sucesso na transferência para as placas.

4.3. Quantificação da Endostatina recombinante

4.3.1. Imunoensaio (Elisa - Kit Accucyte)

A quantificação da endostatina recombinante no meio condicionado foi feita utilizando-se o kit de ELISA para quantificação de endostatina murina (Cytimmune). A quantidade de endostatina detectada em cada amostra foi comparada com uma curva padrão de endostatina que demonstra uma relação inversa entre a densidade óptica (D.O.) e a concentração da proteína (eixos Y e X respectivamente). A determinação da concentração das amostras desconhecidas foi feita plotando-se os valores das densidades óticas obtidas para estas amostras no eixo Y e traçando-se uma linha vertical até a intersecção com a curva das amostras padrão. A partir deste ponto gerado na curva foi traçada uma linha horizontal até a intersecção com o eixo X, determinando-se desta forma a concentração das amostras. A quantificação da endostatina expressa pelos diferentes clones testados está representada na tabela 2.

Tabela 2: Quantificação da endostatina expressa nos clones que apresentaram valores dentro do limite de sensibilidade no teste de ELISA.

Clone	Expressão de endostatina ($ng/10^6$ células/dia)
11-6	16,6
11-16	55,2
16-2	158,6
16-6	162,3
16-13	200,0
16-14	383,4
16-21	235,3

A curva obtida com as amostras padrão está representada na figura 8.

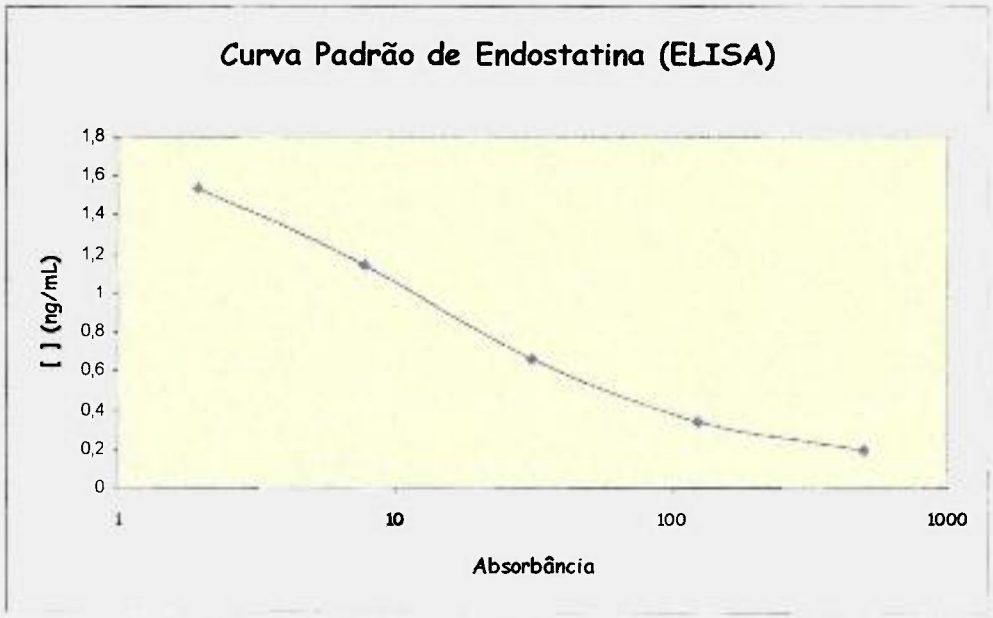


Figura 8: Curva obtida com as amostras padrão de endostatina no ensaio ELISA (Kit Accucyte).

4.4. Caracterização e análise da atividade biológica da endostatina recombinante

4.4.1. Western Blotting

Por meio da análise em western blotting, utilizando-se como controle negativo o meio condicionado de células LM(TK-) não transfectadas, observou-se a expressão de endostatina recombinante pelas células transfectadas (clone 16-14), confirmada pela visualização de uma banda de aproximadamente 20 KDa que corresponde ao peso molecular da endostatina (Figura 9).

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP-IPEN

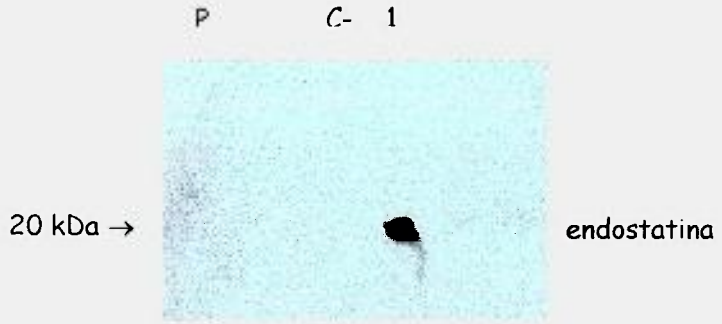


Figura 9: Análise em western blotting da expressão de endostatina.(P) padrão de peso molecular, (C-) controle negativo, (1) meio condicionado do clone 16-14.

4.4.2. Ensaio de Proliferação das Células Endoteliais

O ensaio foi realizado em duplicata e a partir dos resultados de contagem de partículas beta obtidos, foi calculada a média de cada uma das amostras. Para determinar a porcentagem de inibição de crescimento para cada amostra padronizou-se o resultado de contagem de partículas beta obtido no controle negativo como 0% de inibição de crescimento das células endoteliais, e a partir deste valor foi calculada a porcentagem de inibição de crescimento para cada amostra. A determinação da porcentagem de inibição de crescimento (PIC) foi realizada determinando-se primeiramente a porcentagem de crescimento (PC) através da equação: (resultado de contagens da amostra / resultado de contagens do controle negativo) x 100 = PC(%). A porcentagem de inibição de crescimento foi determinada através da equação: 100 - PC = PIC (%).

Os resultados obtidos a partir da endostatina produzida pelos clones selecionados (Tabela 3 e Figura 10), provenientes da transfecção com os clones 11 e 16, mostraram uma atividade antiangiogênica da endostatina recombinante, o que foi observado através da inibição de crescimento das células endoteliais. Como controle positivo foram aplicadas amostras de endostatina purificada obtida de *E. coli* transformada com pETKH-1 e como

controle negativo aplicou-se meio condicionado de uma cultura de células LM(TK-) não transfectadas.

Tabela 3: Porcentagem de inibição de crescimento das células endoteliais para as diferentes amostras testadas.

Amostra	PIC (%)
11-6	19,4
16-6	11,7
16-13	10,1
16-14	22,8
16-21	23,2

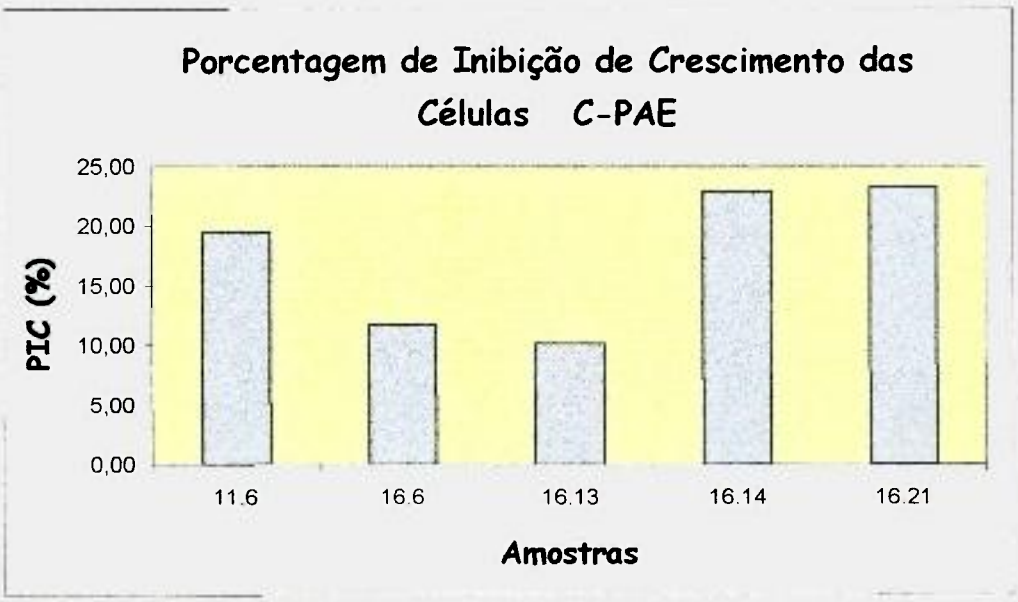


Figura 10: Ensaio de proliferação das células endoteliais. Porcentagem de inibição de crescimento das células para as diferentes amostras.

Foi demonstrada também a incorporação de ^{3}H timidina pelas células endoteliais, utilizando-se diluições 1:1, 1:10 e 1:100 de endostatina obtida de *E. coli* (Figura 11), demonstrando a relação dose-dependente da ação da endostatina.

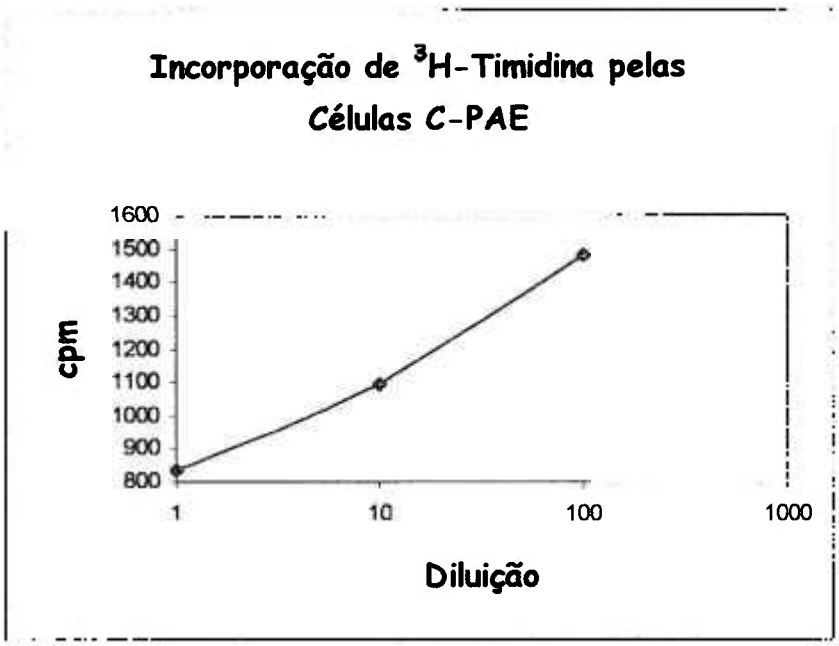


Figura 11: Ensaio de proliferação de células endoteliais demonstrando a incorporação de 3H-timidina pelas células C-PAE. Diluições de amostras de endostatina expressa em *E. coli*.

5. DISCUSSÃO

A expressão de endostatina murina recombinante foi obtida, a partir de uma linhagem estabelecida de fibroblastos murinos LM(TK-), estavelmente transfectada com o vetor comercial de expressão em células de mamíferos pSecTag2/hygro A, onde foi clonado o gene da endostatina murina.

Optamos pela utilização de células eucariotas, nas quais a expressão de proteínas recombinantes na forma solúvel e biologicamente ativa pode ser freqüentemente obtida, enquanto as proteínas expressas em bactérias são freqüentemente obtidas na forma insolúvel e possivelmente biologicamente inativas (Geisse e cols., 1996). Além disso, o sistema de expressão obtido poderá ser utilizado como ferramenta para a possível aplicação em terapia gênica em camundongos C3H, da mesma linhagem de onde foram provenientes os fibroblastos LM(TK-).

A escolha de um sistema de expressão para produção de proteínas recombinantes depende de diversos fatores que incluem características da linhagem celular escolhida, níveis de expressão, expressão intracelular e extracelular, modificações pós-traducionais e atividade biológica da proteína de interesse (Makrides, 1999). Estes fatores são determinantes para a escolha do tipo celular e do vetor de expressão que será utilizado para a introdução de seqüências heterólogas na linhagem celular (Kane, 1991).

Optamos por utilizar células de mamíferos pelas vantagens destas células apresentarem um reconhecimento eficiente de sinais para síntese, processamento e secreção de proteínas (Makrides, 1999). Os sistemas de expressão em células de mamíferos compreendem uma abundância de linhagens celulares utilizadas para produção de proteínas. Mais comumente, as células

CHO (Chinese Hamster Ovary), BHK (Baby Hamster Kidney), HEK 293 (Human Embryonic Kidney), células L de camundongos e linhagens celulares de mieloma (J558L e Sp2/0) são utilizadas como hospedeiras para o estabelecimento de transfectantes estáveis (Geisse e cols., 1996).

No entanto, a expressão bem sucedida de altos níveis de proteínas recombinantes não é dependente somente da linhagem celular (Geisse e cols., 1996). Outras variáveis importantes incluem a própria construção do plasmídeo de expressão (promotor, seqüências reguladoras) e o procedimento de transfecção utilizado para introdução do DNA exógeno na célula eucariota (Geisse e cols., 1996).

Uma consideração a ser feita na escolha de um vetor para se obter altos níveis de expressão, está relacionada aos tipos de elementos de transcrição utilizados para o controle da expressão do gene transferido. Dependendo do propósito do estudo, promotores eficientes acompanhados de amplificadores podem contornar a necessidade de um alto número de cópias de DNA para a obtenção de altos níveis de expressão (Kane, 1991).

Entre os elementos essenciais nos vetores de expressão em células de mamíferos estão: (1) um promotor e um amplificador capazes de atividade transcricional forte, (2) sinais de processamento do mRNA e de tradução que incluem seqüência Kozak, códon de terminação de tradução, sinais de clivagem do mRNA e sinais de poliadenilação, (3) terminador de transcrição, (4) sítios de policlonagem contendo múltiplos sítios de restrição para inserção do gene de interesse, (5) marcadores de seleção para a obtenção de células que tenham integrado estavelmente o DNA plasmídico, e (6) origem de replicação e marcadores de seleção de procariotos para propagação do vetor em bactérias (Makrides, 1999; Levinson, 1990). Além disso é de nosso interesse que o vetor apresente também um peptídeo sinalizador que possibilite a secreção da endostatina recombinante para o meio extracelular. Tendo estes fatores em

vista optamos pela utilização do vetor de expressão em células de mamíferos pSecTag2/hygroA, o qual contém os elementos necessários para obtenção de de expressão de endostatina. Este vetor contém uma sequência de cadeia Ig κ murina, então as proteínas recombinantes expressas por este vetor são proteínas de fusão que contém na porção N-terminal a seqüência de Ig κ murina, que permite sua secreção para o meio extracelular.

Dois importantes elementos responsáveis pelo início da transcrição são o promotor e o amplificador. Os promotores melhor caracterizados são aqueles derivados de vírus, tal como o SV40 e o de citomegalovírus humano (CMV) (Levinson, 1990). Elementos que geralmente compõem o promotor são o TATA box, que funciona designando o local de início da transcrição para a RNA polimerase II, e o CAAT box onde fatores se ligam para facilitar o início da transcrição. Os amplificadores de transcrição agem aumentando o nível de transcrição do promotor e parecem ser reguladores fundamentais da atividade transcricional (Levinson, 1990). Alguns amplificadores demonstram uma preferência por determinada célula hospedeira, enquanto outros, tal como o de CMV, são muito ativos em uma variedade de tipos celulares de diversas espécies (Levinson, 1990). A adição de um amplificador forte pode aumentar a atividade de transcrição de 10 a 100 vezes (Levinson, 1990). O vetor de expressão pSecTag2 é constituído de um promotor/amplificador CMV, o qual deveria propiciar, portanto, a expressão eficiente de altos níveis da proteína recombinante cujo cDNA correspondente estivesse inserido no sítio de policlonagem localizado a 3' do promotor. Este vetor também apresenta um promotor SV40 o qual propicia a expressão do gene de resistência à higromicina, permitindo desta forma a seleção das células transfectadas.

A terminação da transcrição, a clivagem no final 3' e a poliadenilação dos mRNA precursores são passos essenciais para a transcrição do mRNA (Levinson, 1990). Os sinais de terminação da transcrição estabelecem um modo

de minimizar a transcrição da fita de DNA oposta, a qual pode suprimir a expressão gênica pela formação do mRNA anti-sense (Levinson, 1990). O final 3' do mRNA eucariótico é caracterizado pela poliadenilação, que envolve a clivagem a 3' do mRNA precursor em um sítio específico e subseqüente polimerização de aproximadamente 200 bases adenina formando a cauda poly(A), que é importante para a estabilidade do mRNA e sua posterior tradução (Makrides, 1999). A remoção do sítio de poliadenilação pode fazer decair a expressão da proteína mais de 10 vezes (Levinson, 1990). Existem diversos sinais eficientes de poliadenilação utilizados em vetores de expressão em células de mamíferos, incluindo o derivado do hormônio de crescimento bovino (BGH) e o da unidade de transcrição SV40 "early". O vetor de expressão pSecTag2 contém um sinal de poliadenilação BGH, localizado a 3' do sítio de policlonagem, que possibilita uma terminação de transcrição eficiente e a poliadenilação do mRNA transcrito.

A sequência Kozak é determinada pelo contexto de nucleotídeos na vizinhança do códon de iniciação da tradução (AUG). A sequência de bases CC(A/G)CCAUGG foi descrita como sendo a sequência consenso para iniciação nos eucariotas superiores. As purinas A ou G na posição -3 e a G na posição +1 são as maiores influências na eficiência do início da tradução (Makrides, 1999). Mutações alterando esta seqüência consenso resultaram na redução da tradução em mais de 10 vezes (Levinson, 1990). Esta sequência é também constituinte do vetor pSecTag2.

Outros elementos importantes constituintes do vetor pSecTag2 são a origem de replicação pUC e o gene de resistência à ampicilina para seleção de *E.coli* transformadas. Esta origem de replicação em procariotos, permitiu a propagação do vetor em bactérias E.coli possibilitando a amplificação do vetor de expressão contendo o gene da endostatina no decorrer de sua construção.

Além disso, este vetor contém uma origem f1, a qual nos permitiu a obtenção de DNA fita simples, imprescindível para o processo de mutagênese.

O protocolo de mutagênese sítio dirigida utilizando-se oligonucleotídeos, contendo a mutação desejada, como primers (Kunkel, 1985) foi escolhido por apresentar uma alta eficiência e por ser o que melhor se adaptou às nossas necessidades. De acordo com Kunkel (1985) a frequência de mutação gerada utilizando-se este protocolo é superior a 50%. Uma das vantagens desta técnica é a de que mais de um sítio pode ser mutado ao mesmo tempo, utilizando-se somente um oligonucleotídeo com mais de uma mutação para a seqüência alvo (Howe, 1995). O sequenciamento de alguns dos clones corretos obtidos da mutagênese, em uma única tentativa demonstrou a eficiência do método. A partir da reação de mutagênese foi possível colocar o gene da endostatina em fase de leitura com o peptídeo sinalizador, que permite a secreção da proteína para o meio extracelular, como já discutido. Além disso, utilizando-se esta técnica, obtivemos duas construções vetoriais diferentes utilizando-se dois oligonucleotídeos diferentes. O clone 11, o qual se apresentou correto após o sequenciamento, apresenta uma seqüência de 6 histidinas inseridas a 5' do gene da endostatina, enquanto que o clone 16, que também se apresentou correto após o sequenciamento, não apresenta esta seqüência de bases adicionais.

O método de transfecção por coprecipitação de fosfato de cálcio (Graham, 1973) é geralmente preferido na geração de células de mamíferos transfectadas para expressão estável (Kane, 1991). O DNA é misturado com o cloreto de cálcio e o fosfato resultando na precipitação do DNA que é então incubado juntamente com as células a serem transfectadas e capturado via vesículas fagocíticas. O DNA exógeno captado pelas células é então integrado no genoma do hospedeiro (Wigler, 1978). A vantagem deste método é que a geração de linhagens celulares expressando estavelmente o DNA exógeno

integrado constitutivamente é eficientemente alcançada em uma grande variedade de células (Current Protocols in Molecular Biology). Além disso a transfecção com fosfato de cálcio tem sido comumente utilizada para introdução de material genético nas células hospedeiras em estudos de terapia gênica antiangiogênica (Indraccolo e cols., 1999). Baseado nestas informações escolhemos por utilizar este método para transfectar as células LM(TK-) visando a obtenção de expressão estável de endostatina murina recombinante por estas células.

O vetor de expressão utilizado por nós apresenta o gene de resistência à higromicina, e por isso células LM(TK-) não transfectadas foram cultivadas na presença de diferentes concentrações deste antibiótico, para determinação da concentração mínima letal de higromicina para as células, necessária para a seleção dos clones positivos após a transfecção. De acordo com os dados do fabricante do vetor pSecTag2, o intervalo de concentrações letais para células de mamíferos varia de 150 a 400 μg/mL de higromicina no meio de cultura celular. De acordo ainda com a literatura (Kaufman, 1990), as concentrações de higromicina utilizadas para seleção de células de mamíferos estão entre 100 e 300 μg/mL. No entanto, a concentração mínima de higromicina letal para as células LM(TK-) encontrada por nós foi de 600μg/mL, sendo que este resultado está de acordo com os obtidos por Zoeten (1999).

Os meios condicionados obtidos dos clones transfectados e isolados foram submetidos a análises qualitativas e quantitativas da proteína recombinante expressa pelas células LM(TK-). Pela análise dos resultados obtidos por western blotting utilizando-se anticorpo anti-endostatina murina que revelaram uma banda de aproximadamente 20 kDa, correspondente ao peso molecular da endostatina murina, ficou demonstrado que a expressão e secreção de endostatina murina recombinante foi obtida com sucesso a partir deste sistema de expressão.

A quantificação da proteína expressa no meio condicionado de cada clone foi realizada utilizando-se um kit ELISA comercial muito comumente utilizado na quantificação de endostatina murina recombinante obtida por diferentes processos (Indraccolo e cols., 1999; Sauter e cols., 2000; Kuo e cols., 2001; Pawliuk e cols., 2002). Os níveis de expressão obtidos para os diversos clones testados variaram de 16,6 a 383,4 ng/10^6 células/dia. Os clones 11 (6 His-endostatina) apresentaram expressões bastante inferiores a dos clones 16 (endostatina), o que pode ser resultado da inserção da seqüência de 6 Histidinas a 5' do gene da endostatina, ocasionando uma expressão mais baixa de endostatina por estes clones.

A maioria dos autores que descreveram a obtenção de endostatina humana e murina recombinantes relatam apenas as concentrações de endostatina em peso/volume (µg/mL ou mg/L) e sem o conhecimento das concentrações de endostatina recombinante obtidas por número de células, a comparação entre estes dados fica restrita. No entanto, vamos descrever a seguir os trabalhos que obtiveram expressão de endostatina humana e murina recombinantes.

O'Reilly e cols. (1997), demonstraram pela primeira vez a obtenção de 30-40 mg/L de endostatina recombinante murina insolúvel, purificada a partir da utilização de *E. coli* como célula hospedeira. Foi obtida também, a expressão de 150mg/L de endostatina recombinante murina utilizando-se o mesmo sistema: *E. coli* (BL21 pLysS) por Huang e cols. (2001), sendo este o maior nível descrito na literatura. A produção de 40 mg/L de endostatina recombinante murina insolúvel por *E.coli* (YK537), também foi obtida por Xu e cols. (2002).

Foi descrita por Dhanabal (1999a) a obtenção de endostatina humana por *Pichia pastoris* transfectada resultando em níveis de produção de 10 mg/L.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP-IPEN

A expressão transiente de endostatina murina utilizando-se vetores adenovirais foi descrita por Sauter e cols. (2000), que transduziram células JC e obtiveram níveis de 12-16 μg/mL no meio condicionado de 48 horas e por Kuo e cols. (2001), que utilizaram transfecção transiente para a introdução do vetor adenoviral em células 293 e obtiveram níveis de expressão superiores a 10μg/mL no soro de animais tratados. Foi demonstrado (Kuo e cols., 2001) que a expressão *in vivo* de endostatina declina progressivamente com o tempo, decaindo a partir do sétimo dia de tratamento, o que é consistente com a natureza transiente de expressão gênica utilizando vetores adenovirais. Estudos realizados por Sasaki e cols. (1998), revelaram a impossibilidade de detecção (< 2ng/ml) de endostatina murina recombinante no meio condicionado de 10 diferentes linhagens celulares humanas e de camundongos, submetidas à transfecção transiente utilizando-se um vetor episomal, no qual foi clonado o gene da endostatina murina. No entanto, a respeito das linhagens celulares, o autor só relata se tratarem de fibroblastos, células epiteliais e células tumorais. Além disso, baixos níveis (5-15 ng/mL) foram detectados no meio condicionado de células endoteliais microvasculares, células de aorta humana e células de teratocarcinoma F9, nas quais a introdução do gene da endostatina foi realizada da mesma forma. No entanto, células HEK (células renais de embrião humano) submetidas à transfecção transiente com o mesmo vetor episomal de expressão, mostraram, através da análise por radioimunoensaio do meio condicionado, uma expressão variando de 6-20 μg/mL/dia. Semelhantemente, células MDCK (células epiteliais de rim canino) mostraram ser capazes de produzir grandes quantidades (10 mg/L de meio condicionado) de MMP13 (matrix metalloproteinase 13) após ser transfectada estavelmente com um plasmídeo contendo um promotor de CMV, enquanto células CHO transfectadas com o mesmo vetor, produziram muito menos proteína (Pei e cols., 1998). Estes estudos nos levam a concluir que vetores de expressão,

mesmo que construídos para se obter altos níveis de expressão, podem, de acordo com a linhagem celular escolhida como hospedeira, não funcionar eficientemente. Estudos realizados por Indraccolo e cols. (1999) mostraram a obtenção de expressão transiente de endostatina murina utilizando-se um vetor de expressão de células eucariotas, pcDNA3.1V5 com promotor CMV, para transfectar células humanas de rim 293T e KS IMM derivada de sarcoma de Kaposi e a obtenção de níveis de 0,5-2,5 μg/mL no meio condicionado. Apesar do promotor forte de CMV utilizado por Indraccolo, ser o mesmo promotor presente em nosso vetor, os níveis de expressão obtidos por estes autores foram superiores aos níveis de expressão obtidos por nós, lembrando que o vetor utilizado pelo autor foi um com expressão transiente, enquanto o sistema de expressão obtido por nós expressa a proteína recombinante estavelmente.

Foi também demonstrada a expressão de endostatina murina e humana no meio condicionado de células HUVEC transformadas por transfecção transiente com plasmídeo de expressão contendo promotor/amplificador de CMV, em níveis equivalentes a 10 ng/10^6 células/dia no meio condicionado para as duas proteínas (Blezinger, 1999). Estes resultados são bastante inferiores aos obtidos por nós (383,4 ng/10^6 células/dia), o que novamente indica que o uso de um promotor forte como CMV nem sempre garante altos níveis de expressão.

Para considerarmos o uso do sistema de expressão descrito neste trabalho em estudos de terapia gênica antiangiogênica pelo transplante em camundongos de células transfectadas e mantidas em imunoisolamento (biohíbridos), devemos levar em conta alguns dados da literatura, como a dose necessária de endostatina murina para a inibição do crescimento de tumores sólidos.

Foi demonstrado por O'Reilly e cols. (1997), que o crescimento de metástases foi quase completamente suprimido pela administração de endostatina numa dose de 0,3 mg/kg/dia, administrado subcutaneamente. A quase completa regressão tumoral foi obtida administrando-se uma dose de 20 mg/kg/dia (O'Reilly e cols., 1997). Além disso, outros estudos mostram que o tratamento com endostatina murina requer uma injeção diária de altos níveis (10-20 mg/kg/dia)(Kisker e cols., 2001).

Para investigar se a endostatina murina recombinante na forma solúvel poderia resultar na regressão tumoral, foi obtida por Pawliuk e cols. (2002) a secreção contínua intravascular de endostatina recombinante, através da transferência genética mediada por retrovírus em células hematopoiéticas, seguido de seu enxerto na medula óssea de camundongos singeneicos irradiados. Apesar dos altos níveis de expressão (746 ng/mL) encontrados nos soros dos animais testados, não foi observada por Pawliuk a inibição de angiogênese "in vivo" e nenhuma atividade antitumoral foi detectada. Kerbel e Folkman (2002) sugerem que provavelmente seja necessário o ajuste dos níveis de endostatina no sangue para uma concentração de aproximadamente 250-300 ng/mL para obtenção de inibição máxima de crescimento dos tumores.

Pela administração intramuscular de doses diferentes de um plasmídeo de expressão contendo o gene da endostatina murina, Blezinger e cols., (1999) observou que uma dose de 15 μg do plasmídeo de expressão foi tão efetiva quanto uma dose de 240 μg, enquanto uma dose de 7,5 μg de plasmídeo administrado, resultou numa diminuição significativa na inibição do crescimento tumoral. Além disso, foram determinados os níveis de endostatina murina no soro destes animais e a única dose de injeção plasmidial que demonstrou níveis de endostatina circulante detectáveis até o 14° dia após a injeção foi a de 240 μg. No entanto, os níveis de proteína detectados foram

bastante baixos sendo 3, 8 e 4 ng/mL nos dias 2, 7 e 14, respectivamente, após a administração intramuscular do plasmídeo.

A completa inibição do crescimento tumoral e a regressão tumoral foram reportadas com relação ao uso da forma precipitada de endostatina murina recombinante produzida em *E. coli* (O'Reilly e cols., 1997; Bohem e cols., 1997; Dhanabal e cols., 1999a e Sasaki e cols., 1998), e também com relação à endostatina solúvel administrada continuamente (Kisker e cols., 2001).

Existem algumas restrições importantes com relação ao uso da endostatina para o tratamento antiangiogênico de tumores e uma delas é a quantidade muito alta necessária para obtenção do efeito antiangiogênico. Os trabalhos que utilizam a endostatina para tratamento antiangiogênico e que obtém regressão de tumores sólidos em modelos animais, utilizam a dose de 10 a 20 mg/Kg de camundongo/dia (O'Reilly e cols., 1997; Kisker e cols., 2001 e Boehm e cols., 1997). Se extrapolássemos esses valores para humanos obteríamos uma quantidade de 0,9 a 1,4 g de endostatina por paciente por dia. Utilizando como referência, as doses diárias utilizadas para o tratamento de nanismo com o hormônio de crescimento: da ordem de 35 μg/Kg/dia (por volta de 2,4 mg/dia), chegaremos à conclusão de que é inviável o tratamento antiangiogênico de pacientes com tumores sólidos devido à dificuldade de obtenção de quantidades suficientes de endostatina pura.

Foi demonstrado que a meia vida da endostatina humana no soro dos animais é de 10 horas (Kisker e cols., 2001).

Teoricamente a terapia sistêmica utilizando genes anti-angiogênicos deve superar estas dificuldades, assim como a necessidade de se repetir o processo, pela administração contínua da proteína por um longo período de tempo, provendo níveis terapêuticos de endostatina no soro mantidos (Folkman, 1999).

Com base nestas informações, o uso do sistema de expressão estável de endostatina obtido por nós neste trabalho, pode ser de grande valia na aplicação de terapia gênica antiangiogênica, através da expressão contínua de níveis estáveis do fator antiangiogênico endostatina. Além disso, já foi demonstrado que a administração contínua de TNP-470, um inibidor angiogênico de origem fúngica, diminui a dose requerida em até seis vezes e aumenta a eficiência da terapia em comparação com injeções subcutâneas intermitentes diárias (Ingber e cols., 1990). Kisker (2001) realizou estudos utilizando uma bomba osmótica, implantada no dorso dos animais tratados, que permitiu a liberação contínua de endostatina na circulação. Este autor, administrou doses de 2, 6, 12 e 20 mg/mL, via bomba osmótica, a qual liberou na circulação um volume de 1 μL/hora do seu volume total (200 μL). Foi demonstrado ainda por Kisker, que uma dose de 2 mg/kg/dia foi tão efetiva em suprimir o crescimento tumoral quanto uma injeção intraperitoneal de uma dose de 20 mg/kg/dia, mostrando que a administração contínua de endostatina não somente faz diminuir a dose requerida para o tratamento mas também aumenta a eficiência da terapia em vários modelos tumorais murinos e humanos. Kisker demonstrou que a endostatina administrada continuamente, foi mantida em concentrações sistêmicas de 200 a 300 ng/mL durante a sua administração. Estes resultados nos levam a crer que os níveis de secreção de endostatina murina recombinante obtidos em nosso sistema de expressão podem ser satisfatórios e este sistema de expressão contínua deve ser testado para o tratamento de tumores sólidos em camundongos.

A avaliação da atividade biológica da endostatina murina recombinante foi realizada utilizando-se as células endoteliais C-PAE. Estas células são comumente usadas na verificação da atividade antiangiogênica de proteínas e demonstram uma resposta mais reproduzível para endostatina murina (Dhanabal, 1999a), sendo por este motivo utilizada nestes estudos. As

células C-PAE tem sua proliferação inibida pela ação da endostatina murina, de uma maneira dose-dependente. A inibição dose-dependente foi primeiro observada em doses de 100 ng/mL com máxima inibição observada em doses de 600 ng/mL (O'Reilly e cols., 1997). No entanto, já foi observada a inibição de 50% das células endoteliais utilizando-se meio condicionado contendo 1 ng/mL de endostatina murina (Blezinger e cols., 1999). Kisker e cols. (2001) demonstraram que 200 ng/mL de endostatina murina inibiram em 80 a 90% a proliferação de células endoteliais. Interessantemente, Kisker constatou ainda que a endostatina mantida na bomba osmótica por 7 dias inibiu a proliferação das células endoteliais mais efetivamente que a endostatina que estava no animal por um dia apenas. Os resultados de inibição da proliferação das células endoteliais encontrados por nós, mostraram uma inibição de 10,1 a 23,2% para a endostatina obtida pelo sistema de expressão desenvolvido por nós. Estes resultados estão de acordo com os encontrados na literatura, e mostram que a endostatina murina recombinante secretada pelas células LM(TK-) apresenta atividade biológica, como esperado.

Este sistema de expressão poderá ser de grande valia na aplicação para estudos "in vivo", já que ficou demonstrado o aumento da eficácia no tratamento de pacientes com tumores sólidos via administração contínua de endostatina por terapia gênica.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a expressão de endostatina murina e da proteína de fusão 6 Histidinas-endostatina recombinante na forma solúvel foi obtida com sucesso, a partir da transfecção de células LM(TK-) com o vetor de expressão em células eucariotas pSecTag2, onde foi inserido o cDNA da endostatina murina, indicando que os elementos transcricionais e traducionais contidos neste vetor foram satisfatórios para a produção e secreção da proteína recombinante. Ficou demonstrado que o uso de um vetor de expressão contendo um promotor forte (CMV) nem sempre garante altos níveis de expressão. Além disso, a inserção da seqüência de 6 histidinas a 5' do gene da endostatina, pode ter ocasiononado a expressão mais baixa de endostatina pelos clones transfectados, indicando que modificações deste tipo podem influenciar nos níveis de expressão da proteína recombinante.

Considerando-se que já foi demonstrado na literatura que a administração contínua de endostatina apresenta-se muito mais eficaz do que a administração subcutânea diária das mesmas quantidades desta proteína para o tratamento de tumores sólidos, acreditamos que os níveis de expressão de endostatina murina recombinante obtidos em nosso sistema de expressão podem ser satisfatórios para o tratamento por terapia gênica de tumores sólidos em camundongos, por meio de transplante das células recombinantes secretoras de endostatina em imunoisolamento.

Portanto o sistema de expressão contínua obtido por nós neste trabalho, deve ser testado em estudos de terapia gênica antiangiogênica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience,1988.

Berger, A.C., Feldman, A.L., Gnant, M.F.X., Kruger, E.A., Sim, B.K.L., Hewitts, S., Figg, W.D., Alexander, H.R., and Libutt, S.K. The angiogenesis inhibitor, endostatin, does not affect murine cutaneous wound healing. Journal of Surgical Research, 91: 26-31, 2000.

Bergers, G., Javaherian, K., Lo, K. M., Folkman, J., and Hanahan, D. Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. Science, 284: 808-12, 1999.

Blezinger, P., Wang, J., Gondo, M., Quezada, A., Mehrens, D., French, M., Singhal, A., Sullivan, S., Rolland, A., Ralston, R. and Min, W. Systemic inhibition of tumor growth and tumor metastases by intramuscular administration of the endostatin gene. Nature Biotechnology, 17: 343-348, 1999.

Bloch, W., Huggel, K., Sasaki, T., Grose, R., Bugnon, P., Addicks, K., Timpl, R., and Werner, S. The angiogenesis inhibitor endostatin impairs blood vessel maturation during wound healing. FASEB Journal, 14 (15): 2373-6, 2000.

Bohem, T., Folkman, J., Browder, T., and O'Reilly, M.S. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. Nature, 390: 404-07, 1997.

Boocock, C. A., Charnock, J. D., Sharkey, A. M., McLaren, J., Barker, P. J., Wright, K. A., Twentyman, P. R., and Smith, S. K. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flt and KDR in ovarian carcinoma. J Natl Cancer Inst, 87: 506-16, 1995.

Cao, Y.; O'Reilly, M.S.; Marshall, B.; Flynn, E.; Ji, R.; Folkman, J. Expression of angiostatin cDNA in a murine fibrosarcoma suppresses primary tumor growth and produces long-term dormancy of metastases. J Clin Invest, 101 (5): 1055-1063,1998.

Chen, C., Parangi, S., Tolentino, M.J. and Folkman, J. A strategy to discover circulating angiogenesis inhibitors generated by human tumors. Cancer Res, 55: 4230-3, 1995.

Cristofanilli, M., Charnsangavej, C., Hortobagyi, G.N. Angiogenesis modulation in cancer research: novel clinical aproaches. . Nature Reviews, 1: 415-425, 2002.

Dhanabal, M., Volk, R., Ramchandran, R., Simons, M., and Sukhatme, V. P. Cloning, expression, and in vitro activity of human endostatin. Biochem Biophys Res Commun 258: 345-52, 1999a.

Dhanabal, M., Ramchandran, R., Volk, R., Stillman, I. E., Lombardo, M., Iruela, A. M., Simons, M., and Sukhatme, V. P. Endostatin: yeast production, mutants, and antitumor effect in renal cell carcinoma. Cancer Res 59: 189-97, 1999b.

Duan, J.B., Cai, X., Zhang, B.L., Li, Y.Z., Zou, M.J. and Wang, J.X. Efficient secretion of human endostatin in the yeast Pichia pastoris. Biotechnol Lett, 21: 1095-99, 1999.

Dvorak, H.F., Brown, L.F., Detmar, M., and Dvorak, A.M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. Am J Pathol 146: 1029-39, 1995.

Folkman, J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? J Natl Cancer Inst, 82: 4-6, 1989.

Folkman, J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis [see comments]. N Engl J Med, 333: 1757-63, 1995.

Folkman, J. Antiangiogenic gene therapy. Proc Natl Acad Sci USA 95: 9064-66, 1998.

Gasparini, G. The rationale and future potential of angiogenesis inhibitors in neoplasia. Drugs 58: 17-38, 1999.

Gately, S., Twardowski, P., Stack, M. S., Patrick, M., Boggio, L., Cundiff, D. L., Schnaper, H. W., Madison, L., Volpert, O., Bouck, N., Enghild, J., Kwaan, H. C., and Soff, G. A. Human prostate carcinoma cells express enzymatic activity that converts human plasminogen to the angiogenesis inhibitor, angiostatin. Cancer Res, 56: 4887-90, 1996.

Geisse, S., Gram, H., Kleuser, B. and Kocher, H.P. Eukaryotic expression systems: a comparison. Protein Expression and Purification, 8: 271-282, 1996.

Goldman, C.K., Kendall, R.L., Cabrera, G., Soroceanu, L., Heike, Y., Gillespie, G.Y., Siegal, G.P., Mao, X., Bett, A.J., Huckle, W.R., Thomas, K.A., and Curiel, D.T. Paracrine expression of a native soluble vascular endothelial growth factor receptor inhibits tumor growth, metastasis, and mortality rate. Proc Natl Acad Sci U S A, 95: 8795-8800, 1998.

Good, D. J., Polverini, P. J., Rastinejad, F., Le, B. M., Lemons, R. S., Frazier, W. A., and Bouck, N. P. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. Proc Natl Acad Sci U S A, 87: 6624-28, 1990.

Graham, F.L., Van Der Eb, A.G., Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. Virology, 54: 536-539, 1973.

Hahnfeldt P., Panigrahy D., Folkman J., Hlatky L. Tumor development under angiogenic signaling: a dynamical theory of tumor growth, treatment response, and postvascular dormancy. Cancer Res, 59(19):4770-5, 1999.

Hanahan, D., and Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell, 86: 353-64, 1996.

He, Z.Y., Chen, Z.Y., Qiu, C.P., Li, B., Zhang, W.J., and Wu, X.F. Cloning, expression and tumor supression of human endostatin. Acta Biochimica et biophysica sinica, 32 (4): 333-36, 2000.

Hohenester, E., Sasaki, T., Olsen, B. R., and Timpl, R. Crystal struture of the angiogenesis inhibitor endostatin at 1.5 A resolution. Embo Journal, 17 (6): 1656- 1664, 1998.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP-IPEN

Hori, A., Sasada, R., Matsutani, E., Naito, K., Sakura, Y., Fujita, T., and Kozai, Y. Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor. Cancer Res, 51: 6180-4, 1991.

Howe, C. Gene Cloning and Manipulation. Cambridge University Press, 1995.

Huang, X., Wong, M. K. K. Q., Zhu, Z., Wang, K, Z. Q. W., Huang, N, Ye C., Gorelik, E., and Li, M. Soluble recombinant endostatin purified from Escherichia coli: Antiangiogenic activity and antitumor effect. Cancer research, 61: 478-481, 2001.

Indraccolo, S., Minuzzo, S., Gola, E., Habeler, W., Carrozzino, F., Noonan, D., Albini, A., Santi, L., Amadori, A., Chieco-Bianchi, L. Generation of expression plasmids for angiostatin, endostatin and TIMP-2 for cancer gene therapy. Int J Biol Markers, 14 (4): 251-256, 1999.

Ingber, D., Fujita, T., Kishimoto, S., Sudo, K., Kanamaru, T., Brem, H. and Folkman, J. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and supress tumor growth. Nature, 348: 555-557, 1990

Joki, T., Machluf, M., Atala, A., Zhu, J., Seyfried, N. T., Dunn, I. F., Abe, T., Carroll, R. S., and Black,P. M. Continuous release of endostatin from microencapsulated engineered cells for tumor therapy. Nature Biotechnology 19: 35-39, 2001.

Jonh, H., Preissner, K.T., Forssmann, W.G., and Standker, L., Novel glycosylated forms of human Plasma endostatin and circulating endostatin-Related Fragments of collagen XV. Biochemistry, 38 (32): 10217-10224, 1999.

Kandel, J., Bossy, W. E., Radvanyi, F., Klagsbrun, M., Folkman, J., and Hanahan, D. Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. Cell, 66: 1095-104, 1991.

Kane, S. E. High-level expression of foregin genes in mammalian cells. Genetic Engineering, 13: 167-182, 1991.

Kaufman, R.J. Selection and coamplification of heterologous genes in mammalian cells. Meth. Enzymol., 185: 537-566, 1990.

Kerbel, R. and Folkman J., Clinical translation of angiogenesis inhibitors. Nature, 2: 727-739, 2002.

Kim, K.J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H.S., and Ferrara, N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. Nature, 362: 841-4, 1993.

Kisker, O., Becker, C.M., Prox, D., Fannon, M., D'Amato, R., Flynn, E., Fogler, W. E., Sim, K.L., Allred, E.N., Pirie-Shepherd, S.R., and Folkman, J. Continuous administration of endostatin by intraperitoneally implanted osmotic pump improves the efficacy and therapy in a mouse xenograft tumor model. Cancer Research 61: 7669-74, 2001.

Kong, H. L., and Crystal, R. G. Gene therapy strategies for tumor antiangiogenesis [see comments]. J Natl Cancer Inst 90: 273-86, 1998.

Kunkel, T.A. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotipic selection. Proc Natl. Acad.Sci, USA, 82: 488-492, 1985.

Kuo, C. J., Farnebo, F., Yu, E. Y., Christofferson, R., Swearingen, R. A., Carter, R., Recum, H. A. V., Yuan, J., Kamihara, J., Flynn, E., D´Amato, R., Folkman, J., and Mulligan, R. C. Comparative evaluation of the antitumor activity of antiangiogenic proteins deliverd by gene transfer. Pnas, 98 (8): 4605-4610, 2001.

Laemmli, U.K. Cleavage of strutural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685, 1970.

Levinson, A. D., Expression of heterologous genes in mammalian cells. Meth Enzymol, 185: 485-511, 1990.

Lin, P., Buxton, J.A., Acheson, A., Radziejewski, C., Maisonpierre, P.C., Yancopoulos, G.D., Channon, K.M., Hale, L.P., Dewhirst, M.W., George, S.E., and Peters, K.G. Antiangiogenic gene therapy targeting the endothelium-specific receptor tyrosine kinase Tie2. Proc Natl Acad Sci U S A, 95: 8829-34, 1998.

Makrides, S. C. Components of vectors for gene transfer and expression in mammalian cells. Protein expression and purification, 17: 183-202, 1999.

Millauer, B., Shawver, L. K., Plate, K. H., Risau, W., and Ullrich, A. Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. Nature, 367: 576-9, 1994.

Nguyen, M., Watanabe, H., Budson, A. E., Richie, J. P., Hayes, D. F., and Folkman, J. Elevated levels of an angiogenic peptide, basic fibroblast growth factor, in the urine of patients with a wide spectrum of cancers [see comments]. J Natl Cancer Inst, 86: 356-61, 1994.

O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R.A., Moses, M., Lane, W.S., Cao, Y., Sage, E.H. and Folkman, J. Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. Cell, 79: 315-28, 1994.

O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen, B. R., and Folkman, J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. Cell, 88: 277-85, 1997.

Parangi, S., OReilly, M., Christofori, G., Holmgren, L., Grosfeld, J., Folkman, J., and Hanahan, D. Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs de novo tumor growth. Proc Natl Acad Sci U S A, 93: 2002-7, 1996.

Park, J.H., Lee, J.M. and Chung, I.S. Production of recombinant endostatin from stably transformed Drosophila melanogaster S2 cells. Biotechnol Letters 21: 720-33, 1999.

Park, J.H., Chang, K.H., Lee, J.M. Lee, Y.H., and Chung, I.S. Optimal production and *in vitro* activity of recombinant endostatin from stably transformed Drosophila melanogaster S2 cells. In vitro cellular & developmental biology-animal, 37 (1): 5-9, 2001.

Pawliuk, R., Bachelot, O.Z., Zurkiya, Y. C. and Leboulch, P. Continuous Intravascular Secretion of Endostatin in Mice from Transduced hematopoietic Stem Cells. Molecular Theraphy, 5 (4): 345-351, 2002.

Pei, D., Yi, J. A high-level mammalian expression system based on the Madin-Darby canine kidney cell line. Protein Expression and Purification,13(2):277-81, 1998.

Pepper, M. S., Ferrara, N., Orci, L., and Montesano, R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. Biochem Biophys Res Commun, 189: 824-31, 1992.

Perletti, G., Concari, P., Giardini, R., Marras, E., Piccinni, F., Folkman, J., and Chen, L. Antitumor activity of endostatin against carcinogen-induced rat primary mammary tumors. Cancer Research, 60: 1793-1796, 2000.

Rastinejad, F., Polverini, P. J., and Bouck, N. P. Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene. Cell, 56: 345-55, 1989.

Read, T.A., Sorensen, D.R., Mahesparan, R., Enger, P., Timpl, R., Olsen, B.R., Hjelstuen, M.H.B., Haraldseth, O., and Bjerkvig, R. Local endostatin treatment of gliomas administered by microencapsulated producer cells. Nature Biotechnology 19: 29-34, 2001a.

Read, T. A., Farhadi, M. Bjerkvig, R., Olsen, B. R., Rokstad, A. M., Huszthy, and Vajkoczy, P. Intravital microscopy reveals novel antivascular and antitumor effects of endostatin delivered locally by Alginate-encapsulated cells. Cancer Research 61: 6830-37, 2001b.

Sasaki, T., Fukai, N., Mann, K., Gohring, W., Olsen, B. R., and Timpl, R. Struture, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. Embo Journal, 17 (15): 4249-4256, 1998.

Sauter, B. V., Martinet, O., Zhang, W. J., Mandeli, J., and Woo, S. L. C. Adenovirus mediated gene trasfer of endostatin in vivo results in high level of transgene expression and inhibition of tumor growth and metastases. Pnas, 97 (9): 4802-4807, 2000.

Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., and Keshet, E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. Nature (359): 843-5, 1992.

Sim, B.K.L., Fogler W.E., Zhou, X.H., Liang, H., Madsen, J.W., Luu, k., O'Reilly, M.S., Tomaszewski, J.E., and Fortier, A.H. Zinc ligand-disrupted recombinant human endostatin: potent inhibitor of tumor growth, safety and pharmacokinetic profile. Angiogenesis, 3: 41-51, 1999.

Taddei, L., Chiarugi, P., Brogelli, L., Cirri, P., Magnelli, L., Raugei, G., Ziche, M., Granger, H. J., Chiarugi, V., and Ramponi, G. Inhibitory effect of full-length human endostatin on in vitro angiogenesis. Biochem Biophys Res Commun, 263: 340-5, 1999.

Wigler, M., Pellicer, A., Silverstein, S., Axel, R. Biochemical transfer of single-copy eucaryotic genes using total cellular DNA as donor. Cell, 14(3):725-31, 1978.

Xu, R., Du, P., Fan, J.J., Zhang, Q., Li, T.P., Gan, R.B. High-level expression and secretion of recombinant mouse endostatin by *Escherichia coli*. Protein Expression and Purification, 24: 453-59, 2002.

Yokoyama Y., Green J.E., Sukhatme V.P., Ramakrishnan S. Effect of endostatin on spontaneous tumorigenesis of mammary adenocarcinoma in a transgenic mouse model. Cancer Res, 60(16):4362-5, 2000.

You, W. K., So, S. H., Lee, H., Park, S. Y., Yoon, M. R., Chang, S. I., Kim, H. K., Joe, Y. A., Hong, Y. K., and Chung, S. I. Purification and characterization of recombinant murine endostatin in E. coli. Exp Mol Med, 31: 197-202, 1999.

Zavadskaya, E.S., Zacharova, E.S., Kadulin, S.G., Kibardin, A.V., Kiselev, S.L., and Gnuchev, N.V. Production of recombinant endostatin in milk of transgenic mice. Russian Journal of Genetics, 37 (9): 1009-13, 2001.

Zetter, B.R. Angiogenesis and tumor metastasis. Annu Rev Med, 407-24, 1998.

Zoeten E., Carr-Brendel V., Markovic D., Taylor-Papadimitriou J., Cohen E.P. Treatment of breast cancer with fibroblasts transfected with DNA from breast cancer cells. J Immunol., 162(11):6934-41, 1999.