



UniCEUB - Centro de Ensino Universitário de Brasília

FACES – Faculdade de ciências da educação e saúde

LUCAS ENDRIO RESENDE DE LIMA

TERAPIA ONCOLÍTICA VIRAL

Trabalho de conclusão de curso apresentado pela forma de artigo científico do UniCEUB como requisito para a conclusão do curso de bacharelado em Biomedicina sob orientação do Prof. Paulo Roberto Queiroz.

BRASÍLIA, 2017

RESUMO

Lucas Endrio Resende de Lima¹

Paulo Roberto Martins Queiroz²

Atualmente, os tratamentos convencionais para câncer se baseiam em cirurgias, quimioterapia e radioterapia, que apesar de suas utilidades e potencial de cura, apresentam limitações em termos de eficácia. Com base nessas limitações, uma proposta terapêutica emergente bastante promissora é a terapia oncolítica viral, uma variação da terapia gênica que se baseia na replicação seletiva de um vetor viral dentro de células cancerígenas, desencadeando a morte de células tumorais por lise e a propagação de novas partículas virais para as demais células malignas adjacentes, podendo alcançar até mesmo as que sofreram metástase. Diversos vírus geneticamente modificados pela técnica de DNA recombinante foram testados em ensaios clínicos, demonstrando boa atividade antitumoral. Nessa revisão foram abordados alguns vetores virais baseados em dois vírus comumente utilizados em estudos clínicos, o Adenovírus e Herpesvírus simples. Estes vírus foram testados em vários tipos de câncer como o melanoma, câncer de fígado e câncer de pâncreas, desde modelos pré-clínico testados em animais até testes clínicos em humanos, apresentando bons resultados em termos de eficácia ou estabilidade da doença. A terapia oncolítica viral também pode ser combinada com outras terapias como quimioterapia e radioterapia, com o objetivo de potencializar a eficácia oncolítica e reduzir algumas limitações inerentes aos agentes viroterapêuticos. O presente trabalho teve como objetivo descrever a aplicabilidade da terapia oncolítica viral no tratamento de câncer, bem como avaliar a sua eficácia.

Palavras chave: Terapia oncolítica viral, Vírus oncolíticos, Adenovírus oncolítico, Herpesvírus simples oncolítico, Viroterapia oncolítica

ABSTRACT

Currently, conventional treatments for cancer rely on surgeries, chemotherapy and radiotherapy, which despite their usefulness and healing potential, under critical conditions of effectiveness. Based on these limitations, a promising emerging therapeutic approach is a viral oncolytic therapy, a variation of gene therapy that relies on the selective replication of a viral vector within cancer cells, triggering a tumor cell death by lysis and propagation of new viral particles to the other adjacent malignant

¹ Graduando em Biomedicina pelo Centro Universitário de Brasília;

² Doutor em Biologia Animal pela Universidade de Brasília;

cells, and can reach even as they metastasized. Several viruses genetically modified by the recombinant DNA technique were tested in clinical trials demonstrating good antitumor activity. In this review, we addressed some viral vectors based on two viruses commonly used in clinical studies, Adenovirus and simple Herpes Simplex virus. This virus has been tested in a variety of cancers such as melanoma, liver cancer and pancreatic cancer, from pre-clinical models tested in animals to clinical trials in humans, showing good results in terms of disease efficacy or stability. Viral oncolytic therapy can also be combined with other therapies such as chemotherapy and radiotherapy to enhance oncolytic efficacy and reduce the inherent limitations of virotherapeutic agents. The present study aimed to describe the applicability of viral oncolytic therapy in the treatment of cancer, as well as to evaluate its efficacy.

Keywords: Viral oncolytic therapy, Oncolytic viruses, Oncolytic adenovirus, Viral therapy, Oncolytic Herpes simplex vírus, Oncolytic virotherapy.

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que no ano de 2030 haverá 27 milhões de casos novos de câncer com 17 milhões de mortes pela doença e 75 milhões de pessoas vivendo com câncer (INCA, 2016a).

De acordo com uma pesquisa realizada em 2012 pelo projeto Globocan/larc, os tipos de câncer mais incidentes no mundo são de pulmão, mama, intestino e próstata, sendo que nos homens, os mais frequentes são câncer de pulmão (16,7%), próstata (15,0%), intestino (10,0%), estômago (8,5%) e fígado (7,5%), enquanto que em mulheres, as maiores frequências são de câncer de mama (25,2%), intestino (9,2%), pulmão (8,7%), colo do útero (7,9%) e estômago (4,8%) (INCA, 2016b).

O início do câncer se dá por um processo lento, surgindo a partir de uma única célula que sofreu mutação, multiplicou-se por mitoses e suas descendentes foram acumulando outras mutações que se somaram, até darem origem a uma célula cancerígena que perdeu seu controle de divisão em consequência da ação conjunta dessas mutações que acometeram genes que atuam nos mecanismos de controle do ciclo celular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

O processo de proliferação celular anormal é referido como neoplasia. As células neoplásicas adquirem certo grau de autonomia e lhes são conferidas uma série de características comuns como: 1) evasão da morte celular programada; 2) potencial

replicativo ilimitado; 3) desenvolvimento de angiogênese; 4) capacidade de invadir tecidos locais e disseminar-se para locais distantes; 5) capacidade de escapar do sistema imune (KUMAR et al, 2013).

Atualmente, os tratamentos convencionais para o câncer se baseiam em cirurgias, quimioterapias e radioterapias. No entanto, apesar de suas utilidades e potencial de cura, cada modalidade de tratamento vem apresentando limitações em termos de eficácia, significativa toxicidade, falta da durabilidade de resposta e no caso da quimioterapia, a emergente resistência aos fármacos utilizados (SIMPSON et al, 2016).

Com base nessas limitações, surgiram nos últimos anos vários experimentos clínicos utilizando metodologias diferentes que propõem tratamentos alternativos ao câncer como terapia oncolítica viral, uma variação da terapia gênica que, de acordo com Bilsland e colaboradores (2016), baseia-se na replicação seletiva de um vetor viral dentro de células cancerígenas, desencadeando a morte das células tumorais por lise e a propagação de novas partículas virais para as demais células malignas vizinhas, podendo alcançar até mesmo as que sofreram metástase. Essa abordagem terapêutica pode também matar células tumorais por meio de mecanismos adicionais, pela indução de linfócitos T tumor-específicos e expressão de moléculas terapêuticas por transgenes, o que potencializa a eliminação de células tumorais (LINDEN, 2010).

Nos últimos anos, a viabilidade dos vírus oncolíticos tem sido bem demonstrada em vários modelos pré-clínicos e clínicos de tumores, com evidência clínica da sua eficácia terapêutica em ensaios clínicos de fase inicial e fase tardia, utilizando uma variedade de vetores virais como: adenovírus, herpesvirus simples, entre outros (AURELIAN, 2013).

A terapia oncolítica viral oferece várias vantagens importantes em relação às abordagens tradicionais como: (1) Maior seletividade terapêutica, uma vez que, somente as células cancerosas sofrerão danos; (2) Evita que tecidos normais sofram exposições excessivas de doses de quimioterapia e radioterapia; (3) Capacidade de destruir células cancerígenas que sofreram metástase (SEYMOUR; FISHER, 2016).

O presente trabalho teve como objetivo descrever a aplicabilidade da terapia oncolítica viral no tratamento de câncer, bem como avaliar a sua eficácia.

2. METODOLOGIA

Foi realizada uma revisão bibliográfica narrativa cujo princípio não se utiliza critérios explícitos e sistemáticos para a busca e análise crítica da literatura, a busca pelos estudos não precisa esgotar as fontes de informações e não se aplica estratégias de busca sofisticadas e exaustivas (ROTHER, 2007).

No total, foram utilizados 37 artigos científicos, os quais foram obtidos das bases de dados Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), EBSCO e Google acadêmico, utilizando as palavras-chave Viroterapia, Terapia viral, Terapia oncolítica viral, bem como os mesmos termos no idioma inglês e espanhol, em um período de busca entre 2002 a 2017. Adicionalmente foram utilizados três livros, dois para enriquecer a teoria acerca de câncer na parte introdutória do trabalho e um na parte de desenvolvimento. Também foram utilizadas 6 páginas da internet, as quais serviram para complementar conceitos que não estavam sendo citados nos artigos. Somaram-se no total 51 referências bibliográficas.

Os artigos utilizados, em sua maioria, trataram a respeito da viroterapia oncolítica como abordagem terapêutica para determinados cânceres, bem como, a utilização de diversos vetores, tratando desde as suas modificações até sua aplicação em ensaios clínicos.

3. DESENVOLVIMENTO

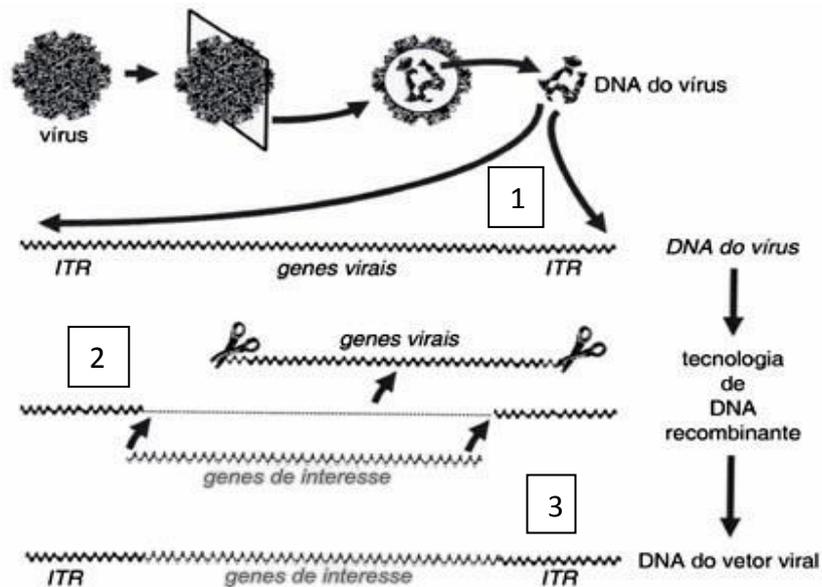
3.1 Construção de vírus recombinante

Vírus oncolíticos são geneticamente modificados por meio da tecnologia do DNA recombinante. A princípio, essa metodologia utilizando vírus consiste em remover genes envolvidos em mecanismos patogênicos e de proliferação viral, mantendo apenas o necessário para invasão das células e o gene de interesse inserido no restante do DNA viral (LINDEN, 2010). No entanto, os vírus oncolíticos, comumente usados em viroterapia, mantêm os genes que lhes conferem a proliferação viral e são condicionalmente replicativos apenas em células tumorais (FARIA, 2010).

A construção de um vírus recombinante (figura 1) acontece, basicamente, por cortes usando enzimas de restrição em regiões específicas do genoma viral contendo genes patogênicos, seguida da inserção de genes de interesse. As regiões terminais invertidas

(ITR), são sequências repetidas que não conferem patogenicidade e, portanto, podem permanecer contidos no vetor (LINDEN, 2010).

Figura 1 – Recombinação do genoma viral.

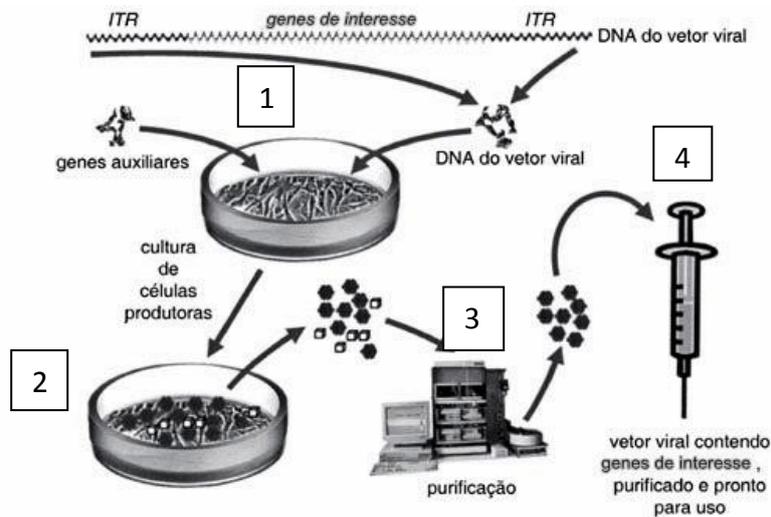


Legenda: 1) Extração da molécula de DNA do vírus selvagem. 2) Retirada de genes virais patogênicos e a adição de transgenes de interesse em sítios específicos. 3) Obtenção do DNA viral recombinante.

Fonte: LINDEN (2010).

Após a recombinação, conforme o esquema da figura 2, o DNA modificado é inserido em um plasmídeo e por meio de precipitação ou eletroporação, são introduzidos em células produtoras no intuito de gerar uma grande quantidade de novas estruturas virais completas que serão posteriormente purificadas para remoção de contaminantes (LINDEN, 2010).

Figura 2 - Produção de novas partículas virais.



Legenda: 1) Incorporação do DNA viral recombinante a um plasmídeo contendo genes auxiliares e inóculo em placas de cultura de células. 2) após a produção de novas partículas virais a amostra são extraídas da placa. 3) Processo de purificação para remoção de contaminantes. 4) Após a purificação, as novas partículas virais recombinantes estão prontas para o uso.

Fonte: LINDEN (2010).

3.2 Estratégias de seletividade

Os vírus oncolíticos são projetados para alcançar a seletividade tumoral por meio de várias estratégias que favorecem a infecção preferencial pela ligação de receptores específicos ou replicação preferencial em células cancerígenas (AURELIAN, 2013).

Uma das estratégias é fazer com que os vírus oncolíticos respondam a fenótipos de complementação que são características de células cancerígenas que favorecem a ação dos vírus, ou seja, o vírus se beneficia de uma deficiência presente na célula transformada para se replicar, enquanto que em uma célula normal sua ação seria inibida. Por exemplo, o adenovírus ONYX-015 não expressa uma proteína viral chamada E1B55kDa, removendo sua capacidade de inativar o gene *p53* celular. Com isso, o vírus não consegue se replicar em células normais, pois as mesmas responderiam induzindo a apoptose e interrompendo a replicação viral, o que não acontece em células tumorais, uma vez que, estas não possuem *p53* funcional, o que permite com que o vírus utilize a maquinaria celular para se proliferar sem interrupções (RIES; KORN, 2002).

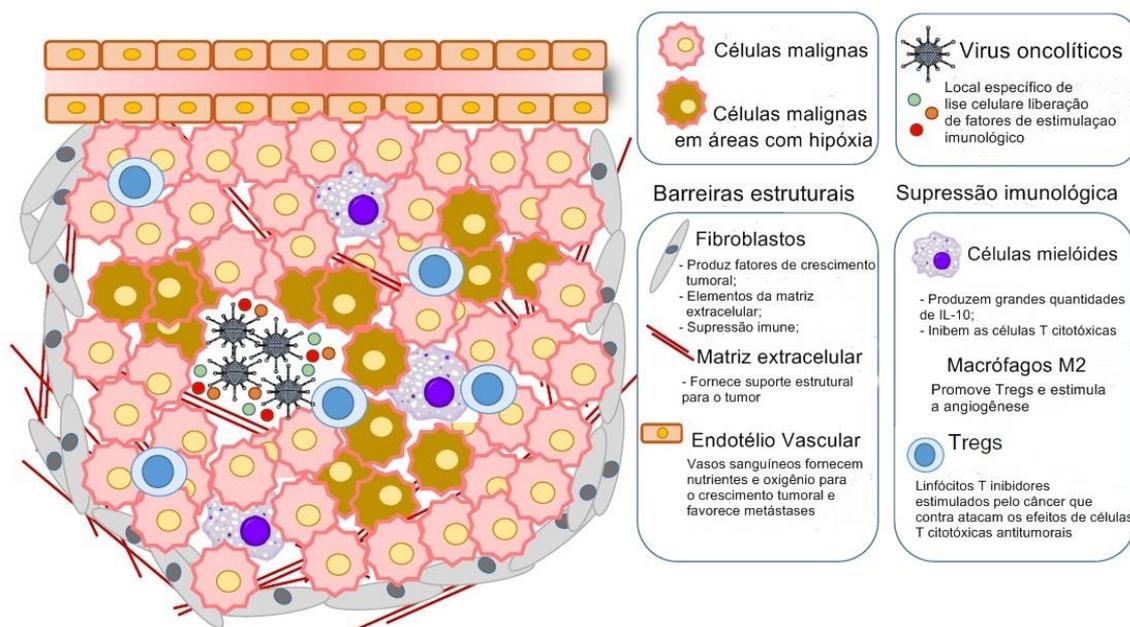
Outra forma de alcançar uma maior seletividade tumoral é projetar vírus para depender de fatores de transcrição presentes em células cancerígenas, utilizando promotores associados ao tumor. Existem vários exemplos dessa metodologia utilizando vários promotores como, por exemplo, o promotor de antígeno específico de próstata humana para regular um adenovírus oncolítico para o tratamento de câncer nesse órgão, ou o promotor de transcriptase reversa de telomerase humana *hTERT* (altamente expressa em células tumorais, mas não em células normais) usado para regular a expressão de CD40 ligante em adenovírus oncolítico (SEYMOUR; FISHER, 2016).

A falha na resposta antiviral mediada por interferons também pode representar uma característica favorável a infecção e replicação viral, uma vez que, segundo Seymour e Fisher (2016), células cancerígenas apresentam deficiências em suas defesas mediadas por interferons, o que muito provavelmente pode estar relacionado a um desequilíbrio associado ao acúmulo de danos genéticos ou como mecanismo de evasão a vigilância imunológica. Aurelian (2013) destaca que células tumorais apresentam altos níveis de RAS ativada, o que para Seymour e Fisher (2016) pode ter relação com a inativação de inúmeras vias de defesa mediadas por interferons devido à deficiência em proteínas quinases RNA-dependente, além de outras mutações que podem comprometer essas vias.

3.3 Barreiras físicas e imunológicas

Apesar das modificações feitas nos vetores visando uma maior seletividade, uma das principais barreiras a serem quebradas é a penetração e disseminação intratumoral, uma vez que os tumores são compostos não só por células malignas, mas também por vários outros componentes celulares e não-celulares como fibroblastos acumulados, matriz extracelular densa, endotélio vascular e células imunitárias de supressão, que promovem o crescimento do tumor e impedem a disseminação dos vetores oncolíticos, limitando sua eficácia terapêutica, conforme esquematizado na figura 3. Além disso, as células tumorais bem como as estromais contribuem para um ambiente tumoral imunossupressor por meio da produção de fatores inibitórios como TGF- β e IL-10, que estimulam células supressoras derivadas da linhagem mielóide, células T reguladoras e macrófagos M2, que expressam VEGF, TGF- β e PD-L1 e criam um ambiente que convertem células T inicialmente direcionadas ao tumor em células T reguladoras (SHAW; SUZUKI, 2016).

Figura 3 - Descrição do microambiente tumoral.



Legenda: Microambiente tumoral constituído não só por células malignas, mas também por vários outros componentes celulares e não celulares que contribuem para a progressão do câncer.

Fonte: SHAW; SUZUKI (2016).

Os vetores virais podem ser administrados diretamente (infusão intratumoral) ou sistemicamente (infusão intravenosa) (CATANI, 2014). No entanto, a administração sistêmica, particularmente desejável para o tratamento de células metastáticas, apresenta algumas dificuldades como rápida eliminação do vírus por opsonização de anticorpos e outras proteínas séricas que facilitam o reconhecimento e eliminação pelo sistema fagocítico mononuclear do fígado e do baço. A destruição dos vírus mediada pelo sistema imune parece ser menos eficaz na infusão local, porém o microambiente tumoral hostil também pode acabar limitando a eficácia terapêutica apenas por essa via de administração (AURELIAN, 2016).

Com base nessas limitações, ao longo de vários ensaios clínicos foram desenvolvidos diversos vírus oncolíticos com o intuito de torná-los cada vez mais direcionados a células malignas e menos suscetíveis às barreiras físicas e imunológicas, aumentando assim a sobrevivência do vírus, favorecendo sua replicação e disseminação pela massa tumoral (BILSLAND; SPILIOPOULOU; EVANS, 2016).

Entre os vetores virais mais utilizados em ensaios clínicos e que já foram amplamente estudados, destacam-se os Adenovírus e Herpesvírus simples. Outros tipos

de vírus podem ser encontrados na literatura, porém o presente trabalho revisa apenas esses dois vírus e seus respectivos modelos de vetores.

3.4 Exemplos de vetores virais

3.4.1 Adenovírus

3.4.1.1 Virologia básica

Os vetores virais baseados em adenovírus são um dos mais utilizados em ensaios clínicos de diversos tipos de câncer, pois segundo Canal e Vaz (2012) estes vírus possuem um genoma bem caracterizado e são relativamente fáceis de manipular, permitindo a inserção de longas sequências de genes sem necessidade de modificar totalmente o genoma original.

São vírus que possuem DNA fita-dupla, não envelopado, de 60-90 nm com simetria icosaédrica e com um genoma linear de aproximadamente 30-38 kb. Foram inicialmente isolados em culturas de células adenóides na década de 1950, e posteriormente em 1956 foram denominados adenovírus em alusão ao tecido em que foram descobertos (GOLDUFISKY et al, 2013).

Em termos de estrutura, os adenovírus são compostos por 252 capsômeros contendo 240 hexons e 12 pentons no vértice do icosaedro. Hexons são polipeptídeos triméricos responsáveis pela montagem das partículas virais enquanto pentons consistem em pentâmeros de polipeptídeos, cuja sua superfície se estende uma proteína chamada “Knob”, responsável pelo reconhecimento e ligação com receptores de superfície celular (VISWANATHAN, 2015).

A princípio, as infecções humanas pelo tipo selvagem do adenovírus são assintomáticas em adultos imunocompetentes, porém em indivíduos imunocomprometidos estão relacionadas a infecções envolvendo geralmente o sistema respiratório, o trato gastrointestinal e a região ocular. Sua transmissão pode ocorrer por vias oro fecal ou respiratória, bem como, por meio do contato direto com sangue contaminado (HOSPITAL INFANTIL SABARA, 2016).

Segundo Goldufsky e colaboradores (2013) os adenovírus são compostos por 52 sorotipos distintos, que podem ser classificados em cinco subgrupos de A a F. Os vírus do subgrupo A e B são caracterizados por induzir tumores, enquanto os do subgrupo C,

D, E e F não são capazes de induzir câncer. Sua capacidade oncogênica se restringe a células de roedores, não sendo capaz de transformar células humanas.

A interação inicial do adenovírus ocorre pela ligação entre o domínio knob da fibra do capsídeo e um receptor de superfície celular chamado “*Coxsackie and adenovirus receptor – (CAR)*”, que promove a internalização do vírus. Além da interação fibra-CAR, outras proteínas de superfície viral como a RGD interagem com integrinas presentes na superfície celular e funcionam como co-receptores que auxiliam no processo de fagocitose (GHOSH, 2006). Após a internalização do vírus, a atividade tóxica das proteínas penton de superfície causam uma ruptura do vacúolo liberando as partículas no citoplasma, que logo em seguida são transportadas para o núcleo por meio da interação entre a proteína hexon da superfície viral e os microtúbulos da célula (VISWANATHAN, 2015).

O genoma adenoviral consiste em duas extremidades constituídas por regiões terminais invertidas que não são codificantes; e entre elas existem duas regiões maiores denominadas E (*Early*), cujo genes são os primeiros a serem codificados, e L (*Late*), que são codificados mais tardiamente. A expressão desses genes está envolvida na regulação do metabolismo celular e montagem da progênie viral (GHOSH, 2006). A tabela 1 apresenta as funções dos genes da região E. A replicação de adenovírus depende inicialmente da expressão do gene E1A, cujos produtos são responsáveis pela dissociação do complexo retinoblastoma Rb/E2F, liberando o fator de transcrição E2F ativado que atua na transcrição dos genes remanescentes E1B, E2, E3 e E4. Os produtos dos genes da região L são proteínas que compõe a estrutura viral e são expressas nos estágios finais da replicação do vírus (SHAW; SUZUKI, 2016).

Tabela 1: Genes adenovirais E (early) e suas funções

Genes	Função
E1	Necessário para a ativação da transcrição de genes iniciais
E2	Necessário para a replicação do DNA do vírus
E3	Necessário para modulação e evasão da resposta imune do hospedeiro, inibição da morte celular programada e lise celular quando as novas partículas estiverem completa
E4	Envolvido no metabolismo e transporte de RNA viral, diminuição da síntese de proteínas da células hospedeira e aumento da replicação do DNA viral

Fonte: GHOSH et al. (2006)

Também, o gene *E1A* induz a expressão de p14ARF, cuja função é acumular p53 no núcleo da célula, o que poderia gerar a apoptose e interromper a atividade viral. No entanto, a região E1 também codifica outro conjunto de genes capazes de prevenir a apoptose, os genes *E1B*, que codificam duas proteínas E1B55K e E1B19K. A proteína E1B19K funciona como um homólogo do proto-oncogene *bcl-2* e previne a apoptose enquanto E1B55K se liga à p53 e, junto a outra proteína viral, E4orf6, a exportam para o citoplasma e a degradam (RISE; KORN, 2002).

3.4.1.2 Modelos de vetores oncolíticos baseados em adenovirus

Um dos primeiros vetores adenovirais utilizados em viroterapia de câncer foi o ONYX-015 (também conhecido como dl1520 ou CI-1042) e foi desenvolvido por Frank McCormick e seu grupo na Onyx Pharmaceuticals. Este vetor se baseia no sorotipo Ad2 e Ad5 e possuem uma deleção de 827 pb na região dos genes *E1B*, o que gera uma proteína E1B55K truncada e, como dito anteriormente, impede que essa proteína se ligue a p53 de células normais e infecte somente células tumorais (RISE; KORN, 2002).

Sua utilização já foi demonstrada em vários ensaios clínicos de fase I a III para numerosos tipos de câncer como carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, glioblastoma, carcinoma hepatocelular, carcinoma colorretal, sarcoma, câncer de ovário, câncer pancreático, câncer hepatobiliar, dentre outros; todos tendo eficácias variáveis (SHARMA, 2009). Após vários estudos com esse vetor, constatou-se que o tratamento utilizando apenas a viroterapia apresentou resultados relativamente limitados em termos de eficácia. No entanto, quando combinado com a quimioterapia, as células

cancerígenas que até então estavam resistentes passaram a apresentar uma maior suscetibilidade aos fármacos (BILSLAND et al., 2016).

ONYX-015 deixou de ser desenvolvido em 2003, porém outro vetor bastante similar chamado H101 foi licenciado na china (Sunway Biotech), porém sua utilização foi aprovada apenas em 2005 para estudos iniciais (SEYMOUR; FISHER, 2016).

O vetor H101 consiste em um adenovírus recombinante de sorotipo 5 que, diferentemente do ONYX-015, possui uma deleção total dos genes *E1B* e contém deleções em alguns seguimentos da região *E3*, que são responsáveis pela inibição da imunidade do hospedeiro. As modificações nos genes *E1B* mantêm o mesmo objetivo apresentando no ONYX-015, no entanto, as deleções nos genes *E3* do *H101* são preteridas no intuito de diminuir a capacidade de inibir a resposta imunitária e, consequentemente, reduzir a propagação da infecção viral. O objetivo dessa estratégia é aumentar a destruição de células tumorais por meio do recrutamento de células T e o reconhecimento de antígenos tumorais. Sendo assim, a via de administração mais adequada é por repetidas injeções locais com o objetivo de manter o nível de eficácia em meio intra-tumoral, uma vez que, a viabilidade sistêmica desse vetor é reduzida (LU et al, 2004).

Em um estudo de fase III feito com H101, foi feita uma comparação dos resultados obtidos pelo tratamento usando apenas quimioterapia e os resultados obtidos da combinação entre viroterapia e quimioterapia, em pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço ou esôfago. A terapia combinada obteve uma taxa de resposta objetiva de 72,7% enquanto que o tratamento feito com quimioterapia obteve apenas 40,4% de resposta, evidenciando que o H101 tem uma atividade antitumoral potencialmente eficaz quando combinada com outras metodologias terapêuticas (SHARMA, 2009).

Outros modelos de vetores foram surgindo, trazendo melhorias em termos de replicação por meio de formas aprimoradas de se atingir um maior tropismo. O DNX-2401 (Ad Δ 24-RGD ou Ad Δ 24), desenvolvido pela DNatrix Therapeutics (EUA), é considerado um vetor adenoviral sorotipo 5 de segunda geração, uma vez que, apresenta modificações que lhe conferem um tropismo alternativo ao câncer. Em termos de genoma, ocorre a reintrodução do gene *E1A* contendo uma deleção de 24pb na região do sítio de ligação a pRb, no intuito de voltar a expandir o tropismo celular. Porém, esse vetor apresenta uma modificação em seu tropismo por conta da substituição do seu domínio knob pelo do sorotipo 3 (Ad3), conferindo-lhe uma seletividade diferente. Foi demonstrado que DNX-2401 expressando domínio knob de adenovírus sorotipo 3

infectaram e se replicaram eficazmente em células de câncer ovariano que já apresentavam resistência ao sorotipo 5 (BILSLAND et al., 2016).

Seguindo essa metodologia de substituição de domínio knob, o vetor ONCOS-102, da Oncos Therapeutics (Finlândia), é um adenovírus sorotipo 5 que também expressa domínio knob do sorotipo 3 e, além do mais, possui o gene de *GM-CSF* no local da deleção dos genes *E3* no intuito de melhorar a imunidade antitumoral. *GM-CSF* recruta células apresentadoras de antígenos (APC) e células NK. Além disso, o *GM-CSF* ativa e matura as APCs presentes no tumor, potencializando assim a capacidade do ONCOS-102 em induzir a imunidade celular contra o tumor em que se replica (RANKI et al., 2016).

Em um estudo feito com 16 pacientes, constatou-se que a infusão intratumoral e intracavitária foi capaz de induzir uma resposta anticancerígena com apenas uma dose, apresentando uma estabilização de 63% da doença em pacientes pré-tratados com outra terapia. O tratamento contínuo resultou em aumento significativo da sobrevida quando comparado com uma única dosagem, confirmando a segurança e doses repetidas. Os resultados foram avaliados radiologicamente e os pacientes que mais se beneficiaram com a viroterapia foram aqueles com sarcoma de tecido mole, câncer ovariano, melanoma e câncer de mama (BILSLAND et al., 2016).

3.4.2 Herpesvírus simples

3.4.2.1 Virologia básica

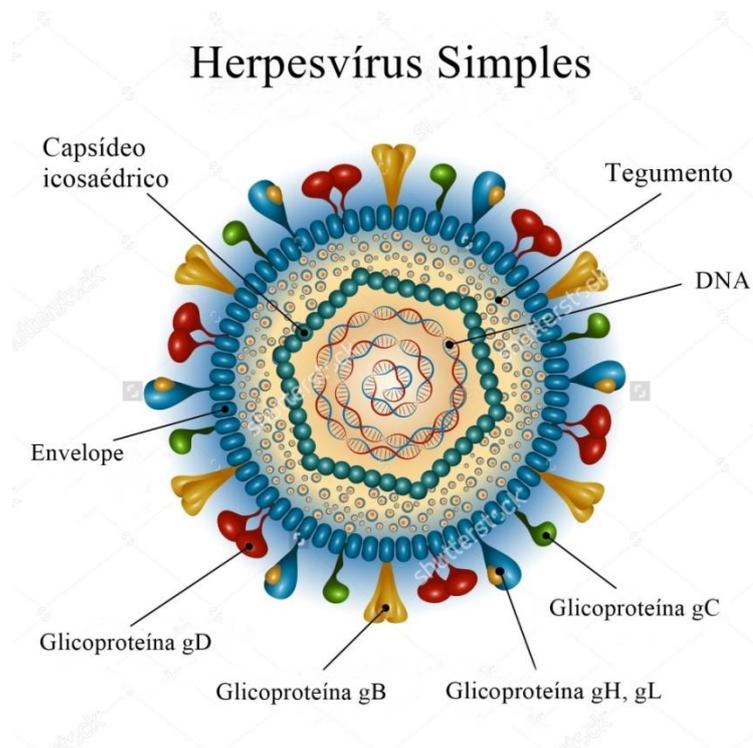
O herpesvírus simples (HVS) ocupa o segundo lugar entre os vetores mais utilizados em abordagens oncolíticas devido à segurança em termos de toxicidade apresentada em diversos estudos e por ser um vírus conhecido, o que facilita a sua manipulação para direcionar sua seletividade e aumentar sua eficácia terapêutica (SOKOLOWSKI et al., 2015).

A família Herpes pode ser subdividida em Alfa-herpes, Beta-herpes e Gamma, sendo HVS pertencente a subdivisão alfa-herpes, juntamente com o vírus varicella, em que ambos representam um dos maiores causadores de doenças associadas a lesões de pele (GOLDUFSKY, 2013).

HVS são vírus de DNA fita-dupla de aproximadamente 152 bp, de simetria icosaédrica, com dimensões entre 150 a 250 nm e, diferentemente dos adenovírus, são envelopados (Figura 4). São classificados em dois sorotipos sendo o HSV-1 responsável

por causar infecções faciais enquanto HSV-2 está mais associado a infecções genitais. Ambas são infecções líticas que ocorrem na superfície de mucosas e geram lesões vesiculares e dolorosas (WAGONER-FOUNTAIN; GROSSMAN, 2004).

Figura 4 - Diagrama estrutural de herpesvirus simples



Legenda: Estrutura da partícula viral de HSV composta por um capsídeo icosaédrico que abriga um genoma de DNA dupla fita. Tegumento abriga proteínas que serão posteriormente liberadas dentro da célula hospedeira. Envelope bilipídico derivado da membrana de células após o processo de brotamento. As glicoproteínas se ligam a receptores específicos e auxiliam no processo de endocitose.

Fonte: SHUTTERSTOCK (2013).

HSV apresentam um tropismo natural ao sistema nervoso e podem causar infecções latentes, ou seja, infectam neurônios sensoriais periféricos e não se replicam, podendo permanecer inativados por muito tempo. A reativação ocorre principalmente após momentos de estresse, baixa imunidade, alterações hormonais e trauma nervoso (GOLDUFSKY, 2013).

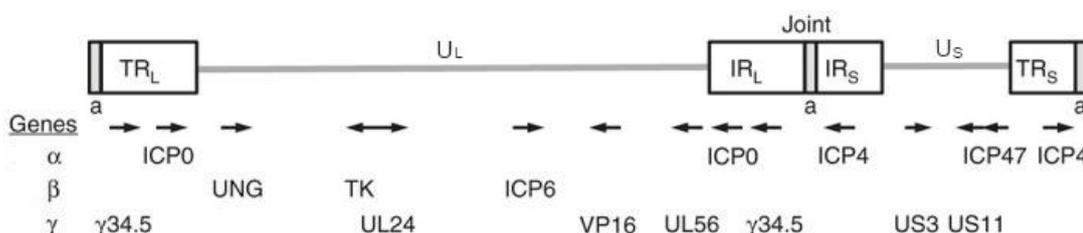
Em termos de estrutura, os herpesvírus simples são compostos por um capsídeo contendo 162 capsômeros envoltos por um envelope bilipídico derivado das membranas

das células do hospedeiro, se apropriando também de alguns glicoproteínas. Entre o capsídeo e o envelope, existe outra estrutura chamada de tegumento, um espaço que contém um material amorfo composto por proteínas que são liberadas dentro das células infectadas após a entrada viral (AURELIAN, 2013).

O processo de transdução celular ocorre pela interação entre glicoproteínas de superfície viral (gB, gC, gD, gH e gL) e receptores da célula hospedeira. Sabe-se até o momento que existem três tipos de receptores de entrada, incluindo sulfato de heparano, mediador de entrada de herpesvírus e nectinas (GOLDUFSKY, 2013). A interação inicial entre vírus e célula ocorre a partir da ligação de gB e gC ao sulfato de heparano, um receptor superficial de membrana celular presente na maioria dos tecidos. Paralelamente ocorre a interação entre gD e o mediador de entrada de herpesvírus e/ou nectina-1, cuja ligação promove as primeiras mudanças conformacionais para a fusão com a membrana celular. gH, juntamente com gL (uma glicoproteína associada a gH), auxilia no processo de fusão de membrana pela sua interação com as integrinas presentes na superfície celular (SOKOLOWSKI et al., 2015)

O genoma de herpesvírus simples, esquematizado na figura 5, é dividido em duas regiões curtas e longas contendo sequências únicas, denominadas U_L e U_S , do inglês *Unique longe Unique short*, respectivamente. A região longa única (U_L) se localiza entre uma região de repetição terminal longa (TR_L) e uma região de repetição interna invertida longa (IR_L), assim como, a região curta única (U_S) se dispõe igualmente entre uma região de repetição terminal curta (TR_S) e uma região de repetição interna curta (IR_S) (WELLER; COEN, 2012).

Figura 5 – Representação esquemática do genoma de HSV



Legenda: O genoma de HSV consiste em sequências longas únicas (U_L) e curtas (U_S) delimitadas por sequências de repetição invertidas (TR) e internas (IR). Os α -genes são imediatamente transcritos e traduzidos, expressando ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 e ICP47, responsáveis por mediar inativações nas repostas inatas e adaptativas no intuito de evadi-

las. Os β -genes expressam proteínas como UNG, TK e ICP16 que auxiliam na síntese do DNA viral. Os γ -genes expressam US11, US3, γ 34.5, VP16 e UL24, que em um contexto geral, estão associados à montagem e empacotamento das partículas virais.

Fonte: (PETERS; RABKIN, 2015)

A replicação de HSV é composto por 3 passos sequenciais. O primeiro passo consiste na transcrição e tradução dos α -genes, que gera cinco proteínas (ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 e ICP47) responsáveis pela regulação de genes, inativação de certas funções imunes inatas e adaptativas. O segundo passo requer a expressão dos β -genes, que resulta na expressão de três proteínas (UNG, TK e ICP16), cujas funções estão associadas diretamente a síntese do DNA viral. O passo final consiste na transcrição e tradução dos γ -genes, após a síntese do DNA, e estão associados à montagem e empacotamento das novas partículas virais (PETERS; RABKIN, 2015).

3.4.2.2 Modelos de vetores oncolíticos baseados em HSV

Segundo Sokolowski e colaboradores (2015), um dos primeiros vetores oncolíticos desenvolvidos foi o *dlsptk*. Esse vetor baseia-se no tipo HSV-1 e contém um deleção dentro de U_L , especificamente no gene 23 (U_L23) que codifica um homólogo viral de timidina quinase (TK), uma enzima que segundo Peters e Rabkin (2015), está envolvida na síntese de desoxitimidina 5'-fosfato (dTMP) a partir de desoxitimidina, bem como, outros análogos de nucleosídeos que geram precursores para síntese do DNA viral. Portanto, a partir dessa deleção o vetor *dlsptk* consegue ter uma maior seletividade tumoral, uma vez que, timidina quinase é superexpressa em células cancerígenas enquanto que em células normais essa enzima é pouca ou não expressa.

Outro vetor bastante citado na literatura é o HrR3, que contém uma mutação de inserção no locus de U_L39 onde é inserido *LacZ*, um gene que expressa uma beta-galactosidase. A princípio, o gene U_L39 expressa uma proteína chamada ICP6, que compõe a ribonucleotídeo redutase (RR) sendo sua subunidade maior. Consequentemente, hrR3 adquire uma maior seletividade tumoral devido a alta expressão de RR em células tumorais (SOKOLOWSKI et al, 2015).

R3616 consiste em um vetor que contém uma deleção em ambas as cópias de $RL1$, o maior gene responsável pela neurovirulência em herpesvírus simples que expressa ICP34.5, um fator de virulência que além de conferir um neurotropismo também atua

inibindo a ação da proteína quinase R (PKR), uma proteína que em células normais fosforila eIF2a ao detectar a presença de um dsRNA viral, prevenindo a síntese de proteínas (SOKOLOWSKI et al., 2015). Com isso, essa mutação é preterida para que haja uma seletividade maior às células tumorais, uma vez que nelas a atividade de PKR é reduzida e a síntese de proteínas é constante, o que favorece a replicação do vetor (AURELIAN, 2013).

Criado a partir de R3616, G207 é considerado um vetor de segunda geração, pois combina mutações que reduz as chances de reversão em um vírus patogênico. Este vetor combina a deleção em ambas as cópias do gene ICP34.5 de R3616 e a mesma inserção de *LacZ* também presente em hrR3. Foi o primeiro vetor oncolítico baseado em herpesvírus simples a entrar em estudo clínico nos Estados Unidos (MARKERT et al., 2014). Em estudos de fase I e II, G207 demonstrou segurança e eficácia em pacientes com gliomas, porém ainda não prosseguiu para estudos de fase III (BILSLAND et al., 2016).

Atualmente um vetor oncolítico de bastante destaque é o T-VEC (Talimogene laherparepvec) também conhecido como Imlygic, que em setembro de 2015 recebeu autorização da Food and Drug Administration (FDA) para o uso no tratamento de melanoma em humanos (BILSLAND, 2016).

Além de apresentar deleção do gene RL1, seu genoma também contém deleções do gene ICP47, que propositalmente facilita a apresentação de antígenos virais, o que ajuda na imunidade antiviral e antitumoral, uma vez que a princípio esse gene inibe esse mecanismo (SOKOLOWSKI et al., 2015). Uma das modificações característica desse vetor é inserção de duas cópias do gene do fator de estimulação de colônia de macrófago e granulócito (GM-CSF), uma citocina humana capaz de recrutar células dendríticas e macrófagos para dentro do tumor e promove a maturação dessas células, permitindo uma melhor apresentação de antígenos tumorais às células T nas regiões dos linfonodos, culminando na estimulação de células TCD8+ que possuem ação citotóxica (REHMAN, 2016).

3.5 ENSAIOS CLÍNICOS

De acordo com a sociedade brasileira de profissionais em pesquisa clínica – SBPPC (2016), os ensaios clínicos de uma nova proposta terapêutica são divididos em fases, que possuem objetivos específicos, mas de modo geral buscam avaliar a eficácia e a

segurança de um novo medicamento. Os objetivos específicos de cada fase estão expostos na tabela 2. Depois de realizadas todas as etapas, os resultados dos ensaios clínicos são avaliados por autoridades regulatórias como a *Food and drug Administration* (FDA), no caso dos Estados Unidos, ou ANVISA no caso do Brasil. Se após a avaliação os resultados forem satisfatórios, essa nova proposta terapêutica recebe autorização para ser comercializada para o público geral.

Tabela 2 - Fases de um estudo clínico

	Testes pré-clínicos	Testes clínicos		
		Fase I	Fase II	Fase III
População testada	Estudos <i>in vitro</i> ou em animais de experimentação	Entre 20 a 100 voluntários saudáveis	Entre 100 a 500 pacientes voluntários	Entre 1000 a 5000 pacientes voluntários
Objetivo	Avaliar segurança e comportamento no organismo	Avaliar segurança, farmacodinâmica e farmacocinética e via de administração	Avaliar a eficácia e investigar os efeitos colaterais	Comparar novo tratamento como tratamento padrão; Estudos randomizados; Confirmar eficácia e monitorar efeitos adversos

Fonte: QUENTAL; FILHO, (2006).

Muitos ensaios clínicos foram desenvolvidos ao longo dos anos em busca de aprimorar a aplicabilidade da terapia oncolítica viral e proporcionar uma metodologia terapêutica mais segura e eficiente. Muitos tipos de câncer são bases de estudos pré-clínicos e clínicos utilizando diversas abordagens específicas para cada tipo de célula, modelos de vetores e vias de administração (FUKUHARA et al., 2016).

3.5.1 Câncer de pele (melanoma)

O melanoma é um tipo de câncer de pele cuja origem se dá a partir dos melanócitos que são células produtoras de melanina, uma proteína que determina a cor da pele. Esse tipo de câncer é um dos mais frequentes no Brasil, representando mais de 30% de todos os tumores malignos registrados no país e atinge principalmente adultos brancos. Embora corresponda apenas 3% das neoplasias malignas referente a esse órgão, o seu risco está associado à sua alta probabilidade de metástase (INCA, 2016c).

Um dos vetores mais associados a estudos com este tipo câncer é o T-VEC, sendo um dos poucos que chegaram a ser testados em estudos de fase III e recentemente recebeu autorização da FDA devido aos seus ótimos resultados obtidos em diversos ensaios clínicos confirmando sua capacidade de gerar uma resposta durável contra o câncer (BILSLAND, 2016).

A segurança deste vetor foi constatada em testes de fase I e II em que doses injetadas por via intratumoral em lesões de melanoma resultaram apenas em febre leve, sintomas semelhantes à gripe e reações de baixa gravidade no local da injeção, além de constatar uma importante regressão tumoral (GOLDUFISKY et al., 2013). Um estudo randomizado de fase III comparou um tratamento de melanoma feito com T-VEC, que expressa GM-CSF e outro com apenas administração GM-CSF sozinho. Foi constatado que os pacientes tratados com T-VEC apresentaram uma resposta significativamente maior em relação aos pacientes tratados apenas com GM-CSF, resultando em uma sobrevida de 23 meses contra 19 meses, respectivamente (BABIKER et al., 2017).

Outro vetor bastante associado a estudos clínicos de melanoma é o adenovírus H101. Em um estudo clínico de fase II, este vetor foi testado em um grupo de pacientes com a doença em estágio avançado e apresentou resultados promissores, onde foi constatada uma taxa de resposta de 28% sendo significativamente maior do que as lesões tratadas apenas com quimioterapia. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de H101 e os resultados obtidos indicaram que este vetor possui um bom potencial anticancerígeno, embora a taxa de regressão tumoral total não foi observada, o que pode estar associado ao estágio avançado das lesões (LU et al., 2004).

Em um estudo de fase III, H101 foi testado em 600 pacientes com melanoma onde foi registrada uma taxa de resposta positiva de 79% quando combinado a quimioterapia, enquanto 40 % de resposta foram obtidos com tratamento apenas com quimioterapia. Com esses e outros resultados, a *Chinese State Food and drug administration* aprovou o

uso de H101 combinado a quimioterapia para o tratamento de melanoma avançado (CHENG et al., 2015).

3.5.2 Câncer de fígado

Os tumores malignos de fígado, também muito estudados em estudos clínicos de viroterapia, consistem em neoplasias que podem ser divididas em dois tipos: câncer primário, cuja origem se dá no próprio fígado, e secundário ou metastático, onde ocorre a aderência e proliferação nesse órgão a partir de uma célula neoplásica que se desprende de outro local. Entre os tipos de tumor primário mais frequente, destaca-se o carcinoma hepatocelular, ocorrendo em mais de 80% dos casos sendo um dos mais agressivos devido a sua probabilidade de metástase (INCA, 2016d).

Um dos primeiros vetores a ser utilizados em ensaios clínicos de câncer de fígado foi o ONYX-015. Um estudo de fase I foi feito com o objetivo de determinar a segurança de ONYX-015 por diferentes vias. Foi constatado que esse vetor demonstrou segurança ao ser administrado por infusão direta e sistêmica, apesar de alguns pacientes terem apresentado sintomas de gripe. Já um estudo de fase II, ONYX-015 foi administrado por infusão arterial hepática e houve replicação local, apesar do desenvolvimento de anticorpos neutralizantes. Foi relatado também que sua combinação com quimioterapia obteve resultados significativos em vários pacientes (CHANG et al., 2009).

Recentemente foi conduzido um estudo clínico utilizando um vetor baseado em vaccinia vírus chamado JX-594, que além de conter uma deleção no gene que expressa Timidina quinase (TK), esse vetor também contém um transgene que expressa GM-CSF. Nesse estudo, pacientes com câncer de fígado receberam o vetor por via intratumoral e após essa administração, constatou-se que JX-594 foi bem tolerado, havendo apenas sintomas transitórios de gripe, porém nenhuma outra intercorrência mais grave ocorreu. Foi registrada uma resposta antitumoral de 30% nos pacientes avaliados e uma redução de mais de 50% dos marcadores séricos de tumor, confirmando essa atividade (FUKUHARA, 2016).

3.5.3 Câncer de pâncreas

Um dos tipos de câncer de pâncreas mais comum é do tipo adenocarcinoma que são neoplasias que se originam no tecido glandular e que apresentam um comportamento

muito agressivo, visto que sua capacidade de metástase é bastante alta (IBRAHIM; WANG, 2016).

Estima-se que de todos os tipos de câncer diagnosticados no Brasil, cerca de 2% é dado com câncer de pâncreas. Por ser um câncer que geralmente tem um diagnóstico tardio devido a sua difícil detecção, o câncer de pâncreas é responsável por 4% do total de mortes por câncer no Brasil (INCA, 2016e).

Os vírus mais utilizados em estudos clínicos de câncer de pâncreas incluem-se principalmente os vetores baseado em adenovírus e herpesvirus. Um estudo clínico de fase I foi feito com 23 pacientes portadores de câncer pancreático utilizou o vetor ONYX-015 como agente terapêutico durante quatro semanas consecutivos por via intratumoral. Seis dos pacientes apresentaram entre 25-49% de regressão tumoral, onze permaneceram com a doença estável e cinco apresentaram uma progressão do tumor. Esses resultados demonstraram que ONYX-015 apresentou boa tolerabilidade e 80% dos pacientes apresentaram regressão tumoral ou sintoma estável (KASUYA et al., 2005).

Um vetor baseado em herpesvirus chamado “HF10” também está bastante associado a ensaios clínicos com esse tipo de câncer. Um estudo clínico de fase I foi conduzido com seis pacientes portadores de câncer pancreático, que receberam três doses de HF10. Foi observado que dos seis pacientes tratados, apenas um apresentou regressão tumoral, três tiveram a doença estabilizada e dois apresentaram progressão tumoral (ADY et al., 2014).

3.6 COMBINAÇÕES COM OUTRAS OPÇÕES DE TRATAMENTO

Apesar de a viroterapia demonstrar ser um tratamento promissor contra o câncer, alguns fatores como a resistência tumoral ou até mesmo a resposta antiviral gera limitações aos agentes viroterapêuticos, resultando numa eficácia moderada. Com base nessas limitações, além das alterações feitas nos vetores para potencializar sua eficácia terapêutica, ao longo dos anos foram desenvolvidas outras estratégias, como por exemplo, associando outras metodologias de tratamento para melhorar a infecção e distribuição viral (SIMPSON, 2016).

3.6.1 Viroterapia combinada a Quimioterapia:

Muitos ensaios clínicos sugerem que a terapia oncolítica viral pode ser idealmente combinada com a quimioterapia, pois exibem uma sinergia capaz de desencadear diversos mecanismos de ação que conseguem burlar os mecanismos de resistência tumoral. Além disso, a combinação entre viroterapia e quimioterapia permite possíveis reduções de dose dos agentes aplicados (BINZ, 2015). No entanto, de acordo com Nguyen et al. (2014), nem todos os tratamentos feitos com essa combinação atingem resultados eficazes, uma vez que os efeitos anticancerígenos dependem do vetor viral, do tipo de célula cancerosa ou do tipo de fármaco utilizado.

Muitos dos agentes quimioterápicos utilizados atualmente para o tratamento de câncer atuam principalmente inibindo a replicação do DNA ou rompendo as estruturas dos microtúbulos. Um dos fármacos utilizados em ensaios que combinam quimioterapia e viroterapia é Ciclofosfamida (CPA). Este fármaco consiste em uma pró-droga que ao ser convertido em um metabólito ativo pela oxidação microsossomal mediada pelo citocromo P450, consegue gerar ligações cruzadas no DNA, inibindo a sua replicação. Além disso, CPA tipicamente é associado à toxicidade hematopoiética e depleção induzida de células B e T, culminando em uma imunossupressão transitória que pode ser revertida após a suspensão do uso desse fármaco (WENNIER et al., 2012).

CPA tem sido extensivamente associado à HSV oncolítico e de acordo com os estudos combinando estes dois agentes, observou-se que CPA melhora a infecção inicial e replicação prolongada de HSV-1 em modelos de glioma de rato. Acredita-se que o aprimoramento da eficácia de HSV esteja relacionado a três mecanismos conhecidos: redução nos níveis de imunoglobulinas pré-existentes, concomitante com redução da ativação do complemento; inibição de respostas antivirais inatas dentro dos tumores e a inibição de respostas imunes antivirais adaptativas (NGUYEN et al., 2014).

Outro fármaco comumente associado a estudos combinados com vírus oncolíticos é o 5-Fluorouracil (5-FU), um fármaco que atua como um antimetabólico, inibindo a biossíntese de DNA e RNA por meio da incorporação errônea de fluoronucleotídeos durante a síntese destes e, além do mais, atua inibindo enzimas envolvidas no processamento dessa molécula (BINZ, 2015). G207 demonstrou ter uma ótima sinergia com 5-FU, resultando em uma sobrevivência prolongada de camundongos com disseminação peritoneal em modelos de câncer de vesícula biliar. Neste relatório, os autores mostraram que o tratamento com 5-FU aumentou a atividade intratumoral e a

disseminação viral dentro dos tumores, sugerindo que este representa um potencial mecanismo de sinergia. 5-FU também é bastante associado com adenovirus. Um estudo feito com células de câncer de pâncreas associando 5-FU e um adenovirus oncolítico demonstrou haver um sinergismo parcial por meio da regulação positiva de CAR, melhorando a infecção pelo vírus nessas células (WENNIER et al., 2012).

Um estudo feito com adenovirus utilizando especificamente o vetor ONYX-015 demonstrou 14% de eficácia em pacientes com câncer de cabeça e pescoço. No entanto, quando combinado com 5-FU e cisplatina, 65% dos pacientes apresentaram uma regressão tumoral significativa. H101 também foi avaliado em pacientes de câncer de cabeça e pescoço em um ensaio clínico de fase III onde apresentou uma taxa de resposta de 79% quando combinado com 5-FU e cisplatina, em contraste aos 40% de taxa de resposta que foram observados em pacientes tratados apenas com quimioterapia (CHEN; SZALAY, 2011).

Em uma visão geral, esses e vários estudos demonstram que, apesar dos mecanismos de sinergia entre as duas terapias não estar totalmente muito bem estabelecidos e a dificuldade de se combinar os agentes que apresentam uma boa sinergia, a viroterapia e a quimioterapia demonstraram ser combinadas com segurança em diversos estudos, justificados com base em sinergias potenciais através de citotoxicidade direta, imunogenicidade indireta e / ou alteração do microambiente tumoral (SIMPSON, 2016).

3.6.2 Viroterapia combinada a Radioterapia:

A combinação entre essas duas terapias tem crescido cada vez mais à medida que as suas relações de sinergia têm sido mais bem compreendidas. A oncólise viral melhorada por intermédio de radiação ou sensibilização vírus-mediada das células tumorais para tratamento radioterápico tem sido demonstrada em diversos estudos pré-clínicos (OTTOLINO-PERRY et al., 2009).

A princípio, a radioterapia consiste na emissão localizada de partículas com alto poder de ionização com o intuito de gerar danos ao DNA, causando uma desestabilização celular que potencialmente leva a destruição dessas células, uma vez que células tumorais não possuem um sistema de reparo tão eficiente quanto às células normais. A desvantagem é que células normais acabam sendo afetadas por essa radiação e por esse motivo as doses de radiação são administradas de forma fracionada, divididas

em semanas para dar oportunidade das células normais se recuperarem dos efeitos da radiação (SALVAJOLI; SALVAJOLI, 2015).

Herpesvírus simples tem sido um dos vírus mais bem estudados em combinações com a radioterapia. Acredita-se que a replicação viral é melhorada por conta da ação da radiação, que estimula a expressão de um gene chamado “GADD34”, caracterizado por ter sua expressão induzida por danos ao DNA principalmente àqueles causados por radiação. A proteína GADD34 possui uma região estrutural semelhante a proteína γ 34.5 do HSV-1 e atua também na desfosforilação de eIF-2, permitindo que a célula sobreviva e continue sua síntese protéica. A maioria dos vetores baseados em HSV possui deleções em γ 34.5 e ao infectar células tumorais previamente tratadas com radioterapia conseguem completar seu ciclo replicativo, pois GADD34 consegue mimetizar a ação de γ 34.5, resultando no aumento da replicação viral sem risco de neurovirulência (OTTOLINO-PERRY et al., 2009).

Muitos estudos também relacionaram alguns adenovírus oncolíticos com radioterapia e relataram que houve um aumento da oncólise tumoral, apesar de que o mecanismo molecular por trás desse aumento ainda não foi bem compreendido, mas há uma hipótese de que possa estar relacionado em parte com o aumento na taxa de replicação viral (TURNBULL et al., 2015).

Em um estudo pré-clínico foi avaliada a combinação entre o vetor adenoviral CV787 e a radioterapia em modelos de câncer de próstata. Foi relatada uma significativa inibição sinérgica do crescimento tumoral que foi capaz de regredir o volume tumoral por completo em 80% dos camundongos em oito semanas após a infecção (OTTOLINO-PERRY et al., 2009).

3.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diversas modalidades terapêuticas alternativas as técnicas convencionais vem sendo desenvolvidas com intuito de aperfeiçoar o tratamento de cânceres, buscando trazer intervenções terapêuticas cada vez mais precisas, menos invasivas e que gere menos desconforto para o paciente. Com essa proposta terapia oncolítica viral está entre as medidas terapêuticas mais promissoras no tratamento de diversos tipos de câncer, uma vez que envolve mecanismos de seletividade que redireciona a infecção viral e além de levar a morte celular direta após a ruptura celular, também promove a morte

indireta de outras células tumorais através da exposição de antígenos tumorais às células imunes, melhorando a resposta antitumoral.

Por se tratar de genoma, os vírus apresentam essa vantagem de poder ser editados e modulados conforme a célula-alvo, porém esses vetores apresentam seus benefícios e limitações. Apesar de apresentar resultados promissores e sua eficácia em alguns estudos clínicos ser comprovada, muitos ensaios clínicos dessa terapia ainda permanece com seus estudos em estágio inicial, sendo poucos os vírus atualmente utilizados em tratamento comercial, como é o caso do T-VEC.

Embora as barreiras físicas e imunológicas possam criar dificuldades na disseminação e infecção viral, muitos vetores têm demonstrado boa sinergia quando combinados a tratamentos convencionais como a quimioterapia e a radioterapia, o que sem sombras, demonstra ser a melhor forma de se utilizar a terapia oncolítica viral no atual momento, enquanto estudos clínicos não a tornam um tratamento totalmente independente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDY, J; HEFFNER, J; KLEIN, E; FONG, Y. Oncolytic viral therapy for pancreatic cancer: current research and future directions. **Oncolytic Virotherapy**, Auckland, v. 2014, n. 3, p. 35-46, fev. 2014.

AURELIAN, L. Oncolytic virotherapy: the questions and the promise. **Oncolytic Virotherapy**, Auckland, v. 2013, n.2, p. 19-29, mar. 2013.

AURELIAN, L. Oncolytic viruses as immunotherapy: progress and remaining challenges. **OncoTargets and therapy**, Auckland, v. 2016, n. 9, p. 2627–2637, maio. 2016.

BABIKER, H; RIAZ, I; HUSNAIN, M; BORAD, M. Oncolytic virotherapy including Rigvir and standard therapies in malignant melanoma. **Oncolytic Virotherapy**, Auckland, v. 2017, n. 6, p. 11-18, fev. 2017.

BILSLAND, A; EVANS, J; SPILIOPOULOU, P. Virotherapy: cancer gene therapy at last. *F1000Research*, London, v. 2105, n. 5, p. 1-10, Ago. 2016.

BINZ, E; LAUER, U. Chemovirotherapy: combining chemotherapeutic treatment with oncolytic virotherapy, **Oncolytic virotherapy**, Auckland, v. 2015, n. 4, p. 39-48, fev. 2015.

CANAL, Cláudio; VAZ, Clarissa. Vacinas víricas. In: FLORES, Eduardo. **Virologia Veterinária: Virologia geral e doenças víricas**. Ed. 2. Santa Maria: UFSM, 2012. p. 3-32.

CATANI, João, *Terapia gênica do câncer associando reparo da via p53 á imunoestimulação por IFN β* . 2014. 140 f. Tese – Programa de oncologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

FARIA, Déborah. *Utilização de poxvírus oncolíticos como ferramenta terapêutica contra o câncer*. 2010. 34 f. Monografia – Pós-graduação em microbiologia, Universidade federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

FUKUHARA, H; INO, Y; TODO, T. Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn. **Cancer science**, Tokyo, v. 107, n. 10, p. 1373-1379, ago. 2016.

CHANG, J; CHEN, P; SZE, D; REID, T; BARTLRITT, D; KIRN, D; LIU, T. Oncolytic virotherapy for advanced liver tumours. **Journal of cellular and molecular medicine**, Bucharest, v. 13, n. 7, p. 1238- 1247, jul. 2009.

CHEN, N; SZALAY, A. Oncolytic Virotherapy of Cancer. In: MINEV, B. *Cancer Management in Man: Chemotherapy, Biological Therapy, Hyperthermia and Supporting Measures*. San Diego: Springer, 2011. p. 295-316.

CHENG, P; WECHMAN, S; MCMASTERS, K; ZHOU, H. Oncolytic Replication of E1b-Deleted Adenoviruses. **Viruses**, Basel, v. 7, n. 11, p. 5767-5779, nov. 2015.

GHOSH, S; GOPINATH, P; RAMESH, A. Adenoviral Vectors: A Promising Tool for Gene Therapy. **Applied biochemistry and biotechnology**, Clifton, v.133, n.1, p. 9-29, abr. 2006.

GOLDUFSKY, Joe. Oncolytic virus therapy for cancer. **Oncolytic Virotherapy**, Auckland, v. 2013, n. 2, p. 31-46, Set. 2013.

HOSPITAL INFANTIL SABARA. **Adenovírus**, 2014. Disponível em: <<http://www.hospitalinfantilsabara.org.br/saude-da-crianca/informacoes-sobre-doencas/abc-saude-infantil/A/adenovirus/>> Acesso em: 15 mar. 2017.

IBRAHIM, A; WANG, Y. Viro-immune therapy: A new strategy for treatment of pancreatic cancer. **World journal of gastroenterology**, Beijing, v.22, n. 2, p. 748-763, jan. 2016.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCAa). **Cuidado Paleativo em câncer**, 2016. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/rbc/index.asp?conteudo=home.asp>> Acesso em: 12 fev. 2017.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCAb). **Incidência do câncer no Brasil**, 2012. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?ID=2>>. Acesso em: 12 fev 2017.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER (INCAc). **Pele melanoma**, 2016 disponível em:<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/definicao> Acesso em: 25 jun. 2017.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER (INCAd). **Fígado**, 2016. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/figado>> Acesso em: 25 jun. 2017.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER (INCAe). **Pâncreas**, 2016. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pancreas>> Acesso em: 25 jun. 2017.

JUNQUEIRA, L; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 9.ed. Rio de janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

KUMAR, V; ABBAS, A; ASTER, J. **Robbins Patologia Básica**. 9.ed Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

KASUYA, H; TAKEDA, S; NOMOTO, S; NAKAO, A. The potential of oncolytic virus therapy for pancreatic câncer. **Cancer gene therapy**, London, v. 12, n. 9, p. 725-736, set. 2005.

LINDEN, Rafael. Terapia gênica: o que é, o que não é e o que será. **Estud. av.**, São Paulo, v. 24, n. 70, p. 31-69, 2010.

LU, W; ZHENG, S; LI, X; HUANG, J; ZHENG, X; LI, Z. Intra-tumor injection of H101, a recombinant adenovirus, in combination with chemotherapy in patients with advanced cancers: A pilot phase II clinical Trial. **World journal of gastroenterology**, Beijing, v. 10, n. 24, p. 3634-3638, dez. 2004.

MARKERT, J; RAZDAN, S; KUO, H; CANTOR, A; KNOLL, A; KARRASCH, M; NABORS, L; MARKIEWICZ, M; AGEE, B; COLEMAN, J; LAKEMAN, A; PALMER, C; PARKER, J; WHITLEY, R; WEICHSELBAUM, R; FIVEASH, J; GILLESPIE, G. A Phase 1 Trial of Oncolytic HSV-1, G207, Given in Combination With Radiation for Recurrent GBM Demonstrates Safety and Radiographic Responses. **Molecular therapy**, San Diego, v. 22, n. 5, p. 1048–1055, maio. 2014.

NGUYEN, A; HO, L; WAN, Y. Chemotherapy and oncolytic virotherapy: advanced tactics in the war against câncer. **Front Oncol**, Lausanne, v. 4, n. 145, p. 1-10, jun. 2014.

OTTOLINO-PERRY, K; DIALLO, J; LICHTY, B; BELL, J; MACCART, J. Intelligent Design: Combination Therapy With Oncolytic Viruses. **Molecular therapy**, San Diego, v. 18, n. 2, p. 251-263, fev. 2009..

PETERS, C; RABKIN, S. Designing herpes viruses as oncolytics. **Molecular therapy oncolytics**, New York, v. 2015, n. 2, p. 1-14, jul. 2015.

QUENTAL, C; FILHO, S. Ensaios clínicos: capacitação nacional para avaliação de medicamentos e vacinas. **Rev. bras. epidemiol.**, São Paulo , v. 9, n. 4, p. 408-424, Dec. 2006 .

RANKI, T; PESONEN, S; HEMMINKI, A; PARTANEN, K; KAIREMO, K; ALANKO, T; LUNDIN, J; LINDER, N; TURKKI, R; RISTIMAKI, A; JAGER, E; KARBACH, J; WAHLE, C; KANKAINEM, M; BACKMAN, C; EULER, M; HAAVISTO, E; HAKONEN, T; HEISKANEN, R; JADERBERG, M; JUHILA, J;

PRIHA, P; SOURANTA, L; VASSILEV, L; VOULANTO, A; JOENSUU. Phase I study with ONCOS-102 for the treatment of solid tumors – an evaluation of clinical response and exploratory analyses of immune markers. **Journal for immunotherapy of câncer**, London, v. 17, n.4, p. 1-18, mar. 2016.

REHMAN, H; SILK, A; KANE, M; KAUFMAN, H. Into the clinic: Talimogene laherparepvec (T-VEC), a first-in-class intratumoral oncolytic viral therapy. **Journal for immunotherapy of câncer**, London, v. 4, n. 53, p. 1-8, set. 2016.

RIES, S; KORN, W. ONYX-015: mechanisms of action and clinical potential of a replication-selective adenovirus. **British Journal of Cancer**, London, v. 86, n.1, p. 5-11, Jan. 2002.

ROTHER, E. Revisão sistemática x revisão narrativa. **Acta Paul Enferm**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 5-6, jun. 2007.

SALVAJOLI, J; SALVAJOLI, B. O papel da radioterapia no tratamento do cancer: avanços e desafios. **Onco&**. São Paulo, v. 13, n. 5, p. 32-36, out. 2012

SEYMOUR, L; FISHER, K. Oncolytic viruses: finally delivering. **British Journal of Cancer**, London, v. 114. n. 4, p. 357-361, fev. 2016.

SHARMA, A; TANDON, M; BANGARI, D; MITTAL, S. Adenoviral vector-based strategies for cancer therapy. **Human vaccines & immunotherapeutics**, Austin, v. 4, n.2, p. 117-138, maio. 2009.

SHAW, A; SUZUKI, M. Recent advances in oncolytic adenovirus therapies for cancer. **Current opinion in virology**, Amsterdam, v. 21, n. 2, p. 9-15, dez. 2016.

SHUTTERSTOCK. *Diagram of Herpes simplex virus particle structure*, Disponível em: <<https://www.shutterstock.com/image-vector/diagram-herpes-simplex-virus-particle-structure-173578478>>. Acesso em: 25. abr. 2017.

SIMPSON, G; RELPH, K; HARRINGTON, K; MELCHER, A; PANDHA, H. Cancer immunotherapy via combining oncolytic virotherapy with chemotherapy: recent advances. **Oncolytic Virother**, Auckland, v. 6, n. 5, p. 1-13, jan. 2016.

STRAUSS, E; STRAUSS, B. Perspectivas da terapia gênica. **Revista de Medicina**, São Paulo, v. 94, n. 4, p. 211- 222, dez. 2015.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PROFISSIONAIS EM PESQUISA CLÍNICA. *Quais as fases de um estudo clínico?*, 2011. Disponível em: http://www.sbppc.org.br/portal/index.php?option=com_content&task=view&id=14&Itemid=37. Acesso em: 25 jun. 2017.

SOKOLOWSKI, N; RIZOS, H; DIEFENBACH, R. Oncolytic virotherapy using herpes simplex virus: how far have we come?. **Oncolytic Virotherapy**, Auckland, v. 2015, n. 4, p. 207-219, nov. 2015.

TURNBULL, S; WEST, E; SCOTT, K; APPLETON, E; MELCHER, A; RALPH, C. Evidence for Oncolytic Virotherapy: Where Have We Got to and Where Are We Going?. **Viruses**, Basel, v. 7, n. 12, p. 6291-6312, dez. 2015.

VISWANATHAN, S; SRINIVASAN, P; PRABHU, S. Adenoviruses in Gene Therapy- A Review. **Bioengineering and Bioscience**, Japan, v. 3, n. 1, p. 1-5, out. 2015.

WAGONER-FOUNTAIN, L; GROSSMAN, L; Herpes Simplex Virus. **Pediatrics in review**, Evanston, v. 25, n. 3, p. 83-96, mar. 2004.

WELLER, S; COEN, D. Herpes Simplex Viruses: Mechanisms of DNA Replication. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, Woodbury, v. 4, n. 9, p. 1-14, set. 2012.

WENNIER, S; LIU, J; MCFADDEN. Bugs and Drugs: Oncolytic Virotherapy in Combination with Chemotherapy. **Curr Pharm Biotechnol**, Hilversum, v. 13, n. 9, p. 1817-1833, jul. 2012.

