

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE
JOAQUIM VENÂNCIO

Joshua Lima Fernandes

VIROTERAPIA ONCOLÍTICA
O que é, desafios e perspectivas

Rio de Janeiro

2018

Joshua Lima Fernandes

VIROTERAPIA ONCOLÍTICA

O que é, desafios e perspectivas

Monografia apresentada à Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio – Fundação Oswaldo Cruz (EPSJV-Fiocruz) como requisito parcial para aprovação no Curso Técnico em Análises Clínicas.

Orientador(a): Mônica Mendes Caminha Murito e Selma Majerowicz

Rio de Janeiro

2018

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, pelo intelecto, pela fé e perseverança em todo esse trabalho.

A minha Mãe, Marcia de Jesus Lima que me apoiou o tempo inteiro de todas as formas possíveis.

Ao meu pai, Eugênio de Souza Fernandes por ter sido sempre compreensivo quando eu tinha que despende tempo neste trabalho.

Ao meu irmão, Calebe de Souza Lima Fernandes por ter respeitado meu tempo e espaço quando estava trabalhando.

A minha orientadora, Mônica Mendes Caminha Murito por ter me dado suporte na forma de todo este trabalho.

A minha co-orientadora, Selma Majerowicz que mesmo aposentada e com dificuldades arrumou tempo de vir me auxiliar na parte teórica.

A meus amigos, Jairton Henrique e Lucas Oliveira por terem me incentivado a prosseguir nessa monografia e me dado dicas importantes.

A meu colega Alexandre Mendonça por ter feito as edições das imagens para a língua portuguesa.

Dedico esse trabalho a todas as pessoas que sofrem com o câncer, seja diretamente ou não. Que a abordagem de novas perspectivas de tratamento possa ser útil no tratamento de todos esses enfermos.

RESUMO

O câncer é a segunda maior causa de morte no mundo segundo a OMS. Enquanto tratamentos convencionais são aprimorados para se tornarem mais eficientes e menos nocivos, estão em desenvolvimento novas técnicas para o tratamento do câncer, entre elas, a viroterapia oncolítica.

A viroterapia oncolítica é uma técnica que consiste na utilização de vírus para a destruição de tecidos cancerígenos. Vírus oncolíticos são utilizados como um tratamento emergente para diversos tipos de cânceres. A técnica se baseia no tropismo viral para conseguir eliminar o tumor com eficiência gerando o menor dano possível ao paciente.

Esse trabalho tem como objetivo compreender a técnica de viroterapia oncolítica e sua aplicação no tratamento de neoplasias. Descreve o histórico, processo de elaboração, os desafios e as potenciais aplicações da técnica. Utiliza a metodologia qualitativa, realizando revisão de bibliografia com base em revistas científicas indexadas na base de dados como Scielo, Medline, Pubmed e Sciencedirect.

Concluimos que com o avanço das técnicas em imunoterapia, quimioterapia e radioterapia, a viroterapia vem como mais um suplemento no combate ao câncer, que tem se mostrado através de experimentos como um tratamento viável.

Palavras-chave: Viroterapia Oncolítica, Câncer, T-VEC

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vírus não envelopados.....	12
Figura 2: Vírus envelopado	13
Figura 3: Vírus Helicoidal.....	13
Figura 4: Estrutura Icosaedrica	13
Figura 5: Vírus com estrutura complexa	14
Figura 6: Replicação	14
Figura 7: Invaginação da membrana celular	15
Figura 8: Penetração de determinados vírus envelopados	16
Figura 9: Liberação de vírus envelopados	17
Figura 10: Diferença entre tumor maligno e benigno	18
Figura 11: Ação sinérgica entre viroterapia e imunoterapia	20
Figura 12: Ação antagônica entre viroterapia e imunoterapia	21
Figura 13: Herpes Vírus	25
Figura 14: Problemas e soluções na aplicação viral	31

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

DCA-Fator de aceleração de decaimento

DNA-cido desoxy ncleioc

FDA-Foods and Drugs Administration

GM-CSF-Fator de crescimento de colnias de Granulócitos

HIV-Vírus da imunodeficiência humana

HSV-Vírus da Herpes

IL-Interleucina 1

INF-Interferon

MAI-Molécula de adesão intercelular

MIP-Proteína inflamatória de macrófagos

MV-Mumps vírus

OMS-Organização Mundial da Saúde

RNA-cido riboxo nucleico

RR-Ribonuclease Redutase

TCD4+ -Timocito CD4+

TCD8+ -Timocito CD8+

SMF-Sistema mononuclear de fagocitose

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	08
OBJETIVOS	10
METODOLOGIA.....	11
CAPÍTULO 1 – VÍRUS, TUMORES, RELAÇÃO DA VIROTERAPIA ONCOLÍTICA COM O SISTEMA IMUNE E SEU HISTÓRICO	12
CAPÍTULO 2 – DESENVOLVIMENTO DA VIROTERAPIA ONCOLÍTICA, T-VEC VÍRUS, OUTROS VÍRUS ONCOLÍTICOS E LIMITAÇÕES	24
CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

INTRODUÇÃO

O câncer é a segunda maior causa de morte no mundo segundo a OMS. (Organização Mundial da Saúde. *Media center.*, 2017). Seu tratamento historicamente é um processo invasivo e muitas vezes nocivo ao paciente.

Nas últimas décadas enquanto os tratamentos tradicionais para o câncer eram aprimorados, outras técnicas vem sendo desenvolvidas, entre elas, a viroterapia oncolítica (HOWELLS *et al.*, 2017). Um vírus oncolítico é aquele que tem uma capacidade natural ou que foi modificado geneticamente para se replicar apenas em tecidos tumorais, evitando o dano a tecidos saudáveis (CHRISTOS *et al.*, 2017 e HIROSHI *et al.*, 2017).

A viroterapia oncolítica se baseia no tropismo, natural ou não, de determinados vírus a tecidos cancerígenos (Russel *et al.*, 2012). O tropismo é a capacidade do vírus de infectar tecidos específicos ao invés de outros (SANTOS *et al.*, 2015).

Uma boa parcela dos vírus que atingem humanos possuem tropismo por tecidos tumorais. Isso se dá devido as características da própria morfologia tumorais, do que por uma característica específica do vírus em si, sendo então mais ligado a uma permissividade celular. Os tumores são conhecidos por evoluírem para não serem detectados pelo sistema imune, desativando características importantes à resposta imune a infecções virais como a inibição da apoptose induzida por linfócitos TCD8+ (RUSSEL *et al.*, 2012).

A história da Viroterapia oncolítica é relativamente antiga. Em meados do século XIX constatou-se que determinadas infecções poderiam regredir tumores. Observou-se que pacientes apresentavam regressão neoplásica após alguma infecção natural. Essas infecções, mais tarde, foram identificadas como infecções virais (KELLY *et al.*, 2007).

A ideia de se utilizar vírus como tratamento especial do câncer tem seu início acadêmico por volta de 1950 (RUSSEL *et al.*, 2014). Centenas de pacientes com câncer começaram a ser tratados com culturas impuras de vírus, até mesmo fluidos corporais infectados eram aplicados diretamente no paciente. A maioria dos virus eram eliminados pelo sistema imune e não surtiam efeito nos tumores, mas algumas vezes a infecção conseguia causar a regressão tumoral, especialmente em pacientes imunodepressivos (RUSSEL *et al.*, 2012). Entretanto, estes pacientes com imunodepressão, frequentemente ficavam doentes e acabavam morrendo devido a infecção se espalhar também pelos tecidos saudáveis (RUSSEL *et al.*, 2012)

O desenvolvimento da técnica de engenharia genética fez com que a viroterapia oncolítica se tornasse mais uma vez alvo de interesse da comunidade científica (RUSSEL *et al.*, 2012). A nova viroterapia oncolítica tem seu marco em uma publicação de 1991, onde um vírus herpes simples (HVS), com um gene de produção da enzima Timidina Cinase deletado e com neurovirulência atenuada se mostrou promissor em um modelo murino de glioblastoma (HOWELLS *et al.*, 2017). A partir desse teste de engenharia genética, diversas novas tentativas de criação de vírus oncolíticos ideais começaram a ser produzidas exponencialmente.

Este trabalho descreve as técnicas em viroterapia oncolítica, seu histórico, seus desafios atuais e as perspectivas de aprimoramento para o tratamento de pacientes com câncer.

OBJETIVOS

O objetivo geral é compreender a técnica de viroterapia oncolítica e suas potenciais aplicações no tratamento do câncer.

Objetivos específicos:

- 1) Compreender os fundamentos da técnica de viroterapia oncolítica
- 2) Descrever os vírus utilizados e pesquisados atualmente.
- 3) Explicar os desafios encontrados na aplicação da técnica e potenciais soluções.

METODOLOGIA

A metodologia aplicada se baseará em busca bibliográfica de livros e análise de artigos científicos, que abordam dados em dissertações e teses sobre a viroterapia oncolítica. Foram usados artigos da base de dados PubMed, Scielo, Medline, Sciencedirect e livros.

CAPITULO 1: FUNDAMENTOS DA VIROTERAPIA ONCOLÍTICA

Nas últimas décadas, enquanto os tratamentos tradicionais para o câncer, como a quimioterapia e a radioterapia, foram melhor desenvolvidos, outras técnicas inovadoras têm emergido, entre elas a viroterapia oncolítica.

A viroterapia oncolítica é uma técnica emergente de combate ao câncer que parte do princípio do tropismo viral, utilizando vírus geneticamente alterados ou detentores de um tropismo natural por células tumorais para efetuar danos ao tecido tumoral sem comprometer o tecido saudável (RUSSEL *et al.*, 2012). Este aspecto é o que justamente torna a viroterapia oncolítica uma técnica que desperta interesses de pesquisadores, devido aos efeitos colaterais nos pacientes serem potencialmente limitados em comparação a tratamentos convencionais. (HOWELLS *et al.*, 2017)

1.1-Vírus

A viroterapia oncolítica utiliza vírus. Vírus são arranjos moleculares contendo em seu interior ácido nucleico, possuindo a capacidade de utilizar a maquinaria celular para se replicarem. (SANTOS *et al.*, 2015). No caso, a célula visada na viroterapia oncolítica são as células tumorais.

Vírus possuem como estruturas básicas, o capsídeo e um ácido nucléico (figura 1), alguns possuem uma terceira estrutura chamada envelope (figura 2) e são denominados vírus envelopados. (SANTOS *et al.*, 2015) O capsídeo é uma capa de proteína que se organiza em formas energeticamente favoráveis, formando estruturas que na natureza se encontram nas formas helicoidal (figura 3), icosaédrica (figura 4) ou complexa (figura 5). Tem a função de proteger o ácido nucléico viral do meio-externo. (SANTOS *et al.*, 2015)

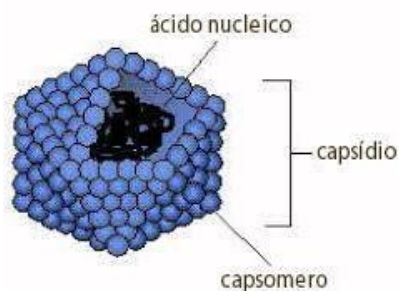


Figura 1: Vírus não envelopado (Adaptado de Dr Gary Kaiser)

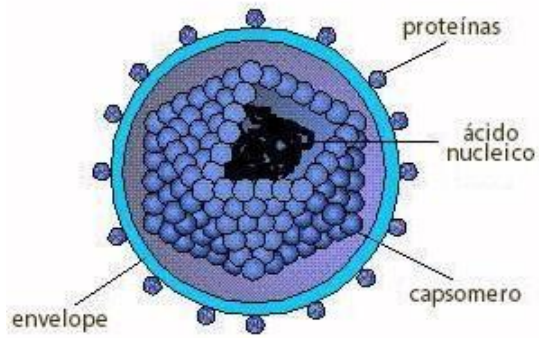
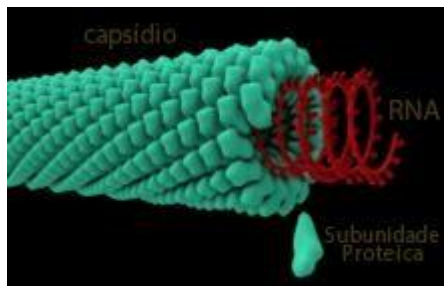
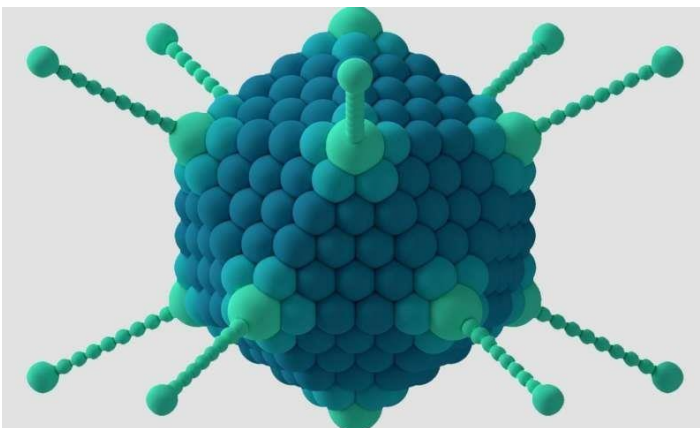


Figura 2: Vírus envelopado (Adaptado de Dr Gary Kaiser)

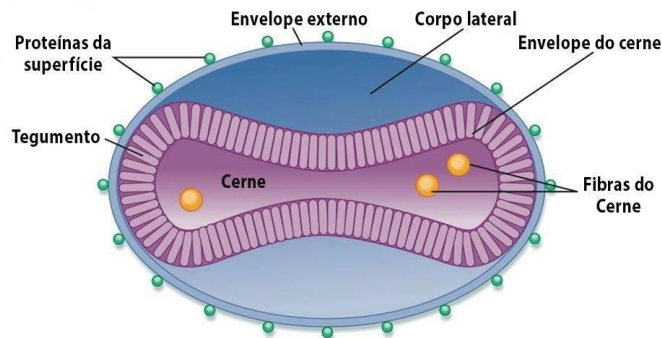


-Figura 3: Vírus Helicoidal (Adaptado de Thomas Splettosster)



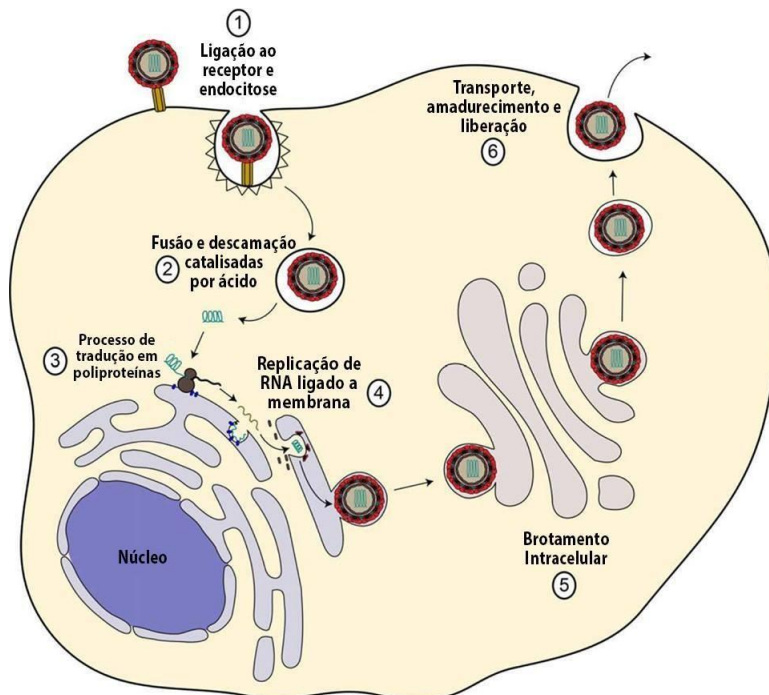
-Figura 4: Estrutura Icosaedrica (Adaptado de Thomas Splettosster)

Estruturas de Vírus Complexas - Partícula de Poxvírus



-Figura 5: Vírus com estrutura complexa (Adaptado de Allan J. Cann)

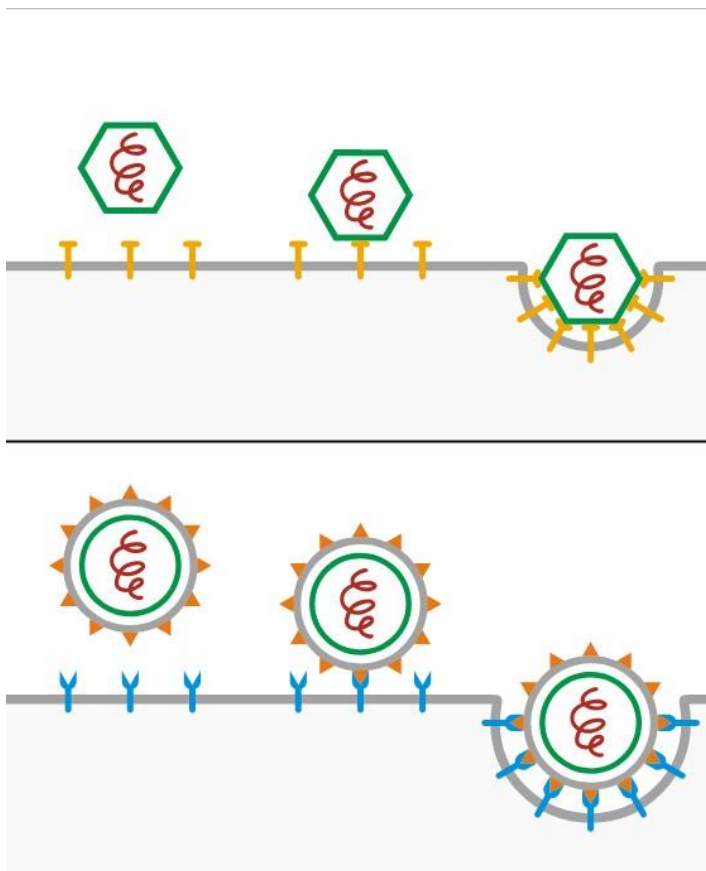
Vírus podem apresentar RNA ou DNA, de fita dupla, simples, circular ou linear. Além disso, a polaridade da fita (-) ou (+) influencia no seu modo de reprodução e classificação (SANTOS *et al.*, 2015). A produção de novos vírus recebe o nome de biossíntese viral ou ciclo de replicação viral (figura 6). Esse processo ocorre através das etapas, adsorção, penetração, desnudamento, biossíntese, montagem e liberação (STPHENS *et al.*, 2010).



-Figura 6: Replicação viral (Adaptado de Gisa Gerold et al)

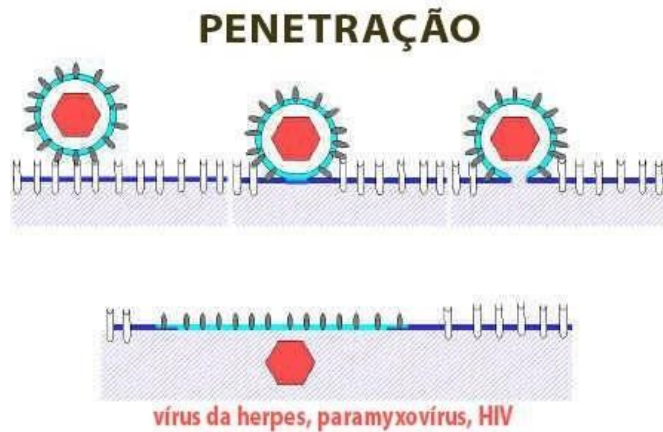
A adsorção é o processo de ligação entre as proteínas da superfície viral (capsídeo ou envelope) no qual elas interagem com proteínas específicas da superfície celular chamadas de receptores (STEPHENS *et al.*, 2010). Essa é uma etapa importante para a viroterapia por estar diretamente ligada a uma espécie de tropismo viral.

A penetração é a internalização viral pela célula. Alguns vírus são endocitados, isto é, são internalizados por um processo celular de invaginação da membrana (figura 7), o qual é mediado por receptores e proteínas chamadas clatrininas. Esse processo também é chamado de Viropeixia (STPHENS *et al.*, 2010).



-Figura 7: Invaginação da membrana celular (Adaptado de Nossedoti “Anderson Brito”)

Alguns vírus, envelopados, se fundem com a membrana celular devido a exposição de aminoácidos hidrofóbicos das glicoproteínas virais na adsorção (figura 8). Há casos em que há a formação de um poro na membrana celular e apenas o material genético viral é internalizado. Existe também o caso em que o vírus inteiro passa pela membrana celular diretamente (SANTOS *et al.*, 2015).



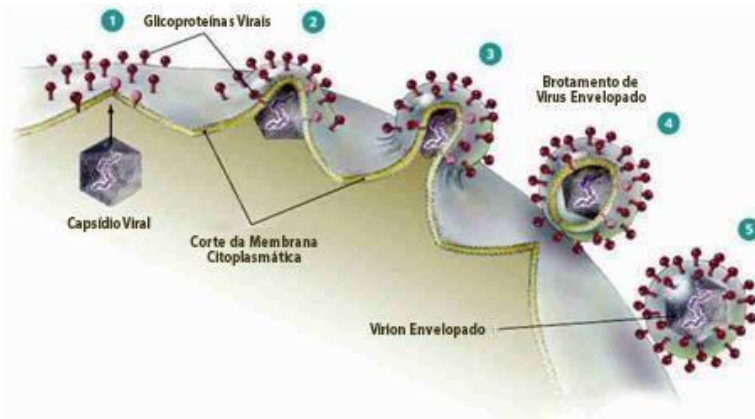
-Figura 8: Penetração de determinados vírus envelopados (Margareth Hunt)

A Biossíntese consiste na tradução e duplicação do conteúdo e material genético viral. Os vírus DNA, replicam a maioria no núcleo já que é lá que está presente toda a maquinaria genética da célula para a duplicação de DNA. Os vírus RNA tendem a se replicarem no citoplasma já que os componentes para a tradução de RNA em proteínas se encontram ali diretamente (SANTOS *et al.*, 2015).

Porém, há exceções como o poxvírus que possuem genoma DNA de fita dupla e se replicam no citoplasma, possuindo em sua carga viral partículas essenciais a síntese de DNA. Assim como retrovírus que são vírus RNA e tem sua biossíntese no núcleo. Estes vírus possuem a transcriptase reversa em seu cerne, a qual tem a função de transcrever o RNA viral em DNA, para então ser duplicado no núcleo (SANTOS *et al.*, 2015).

A montagem é o processo que ocorre após a síntese das proteínas regulatórias, estruturais e da duplicação do RNA ou DNA viral. As proteínas se agregam em torno do genoma viral, gerando o nucleocapsídeo. A maturação é a formação de partículas virais completas, chamadas vírions, em alguns casos isso requer a formação de um envoltório lipídico chamado envelope (STEPHENS *et al.*, 2010)

A liberação do vírus ao meio externo nos vírus não envelopados ocorre devido a lise da célula, recorrente da acumulação de partículas virais. Vírus envelopados são liberados ou por brotamento da membrana externa da célula sem lise, ou brotam de membranas internas sendo expelidos por vacúolos ou vesículas contendo partículas virais já envelopadas (figura 9) (SANTOS *et al.*, 2015)



-Figura 9: Liberação de vírus envelopados (Adaptado de “Look for Diagnosis”)

1.1.2-Tropismo Viral

O estudo da Viroterapia Oncolítica está diretamente relacionado a uma característica viral chamada tropismo. Tropismo é definido como a capacidade do vírus em infectar um tecido específico ao invés de outros. (SUELY *et al*, 2015) Por exemplo, os vírus da Hepatite possuem tropismo pelo tecido hepático enquanto o vírus da raiva pelas células neuronais. O HIV apresenta tropismo pelas células TCD4+ e o Influenza pelas células do epitélio respiratório. Existem vírus chamados de pantrópicos por possuírem tropismo por variados tipos celulares (SANTOS *et al.*, 2015 e RUSSEL *et al.*, 2012).

O tropismo é determinado por três fatores principais: A suscetibilidade que consiste na existência de receptores celulares suscetíveis ao vírus; A permissividade em que os componentes celulares permitem a síntese viral e a acessibilidade que é a capacidade de um vírus acessar o tecido infectado. Além de todos esses fatores é necessário que o vírus não seja eliminado pelo sistema imune do hospedeiro (SUELY *et al.*, 2010).

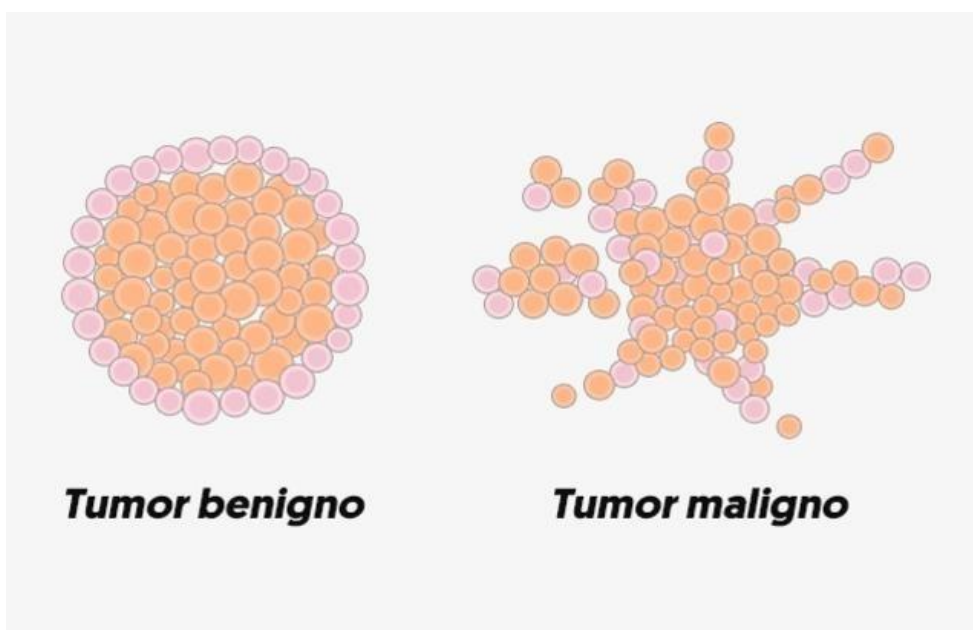
1.2-Câncer

Câncer é o nome dado há mais de cem doenças que tem como característica em comum, o crescimento desordenado de células que podem se espalhar invadindo tecidos adjacentes e se replicando por diversos órgãos do corpo através de metástase. (INCA., 2011)

O câncer está relacionado a alteração do ciclo celular. Há dois tipos de crescimentos celulares: os controlados e os não controlados. Entre os controlados estão displasias e metaplasias. Esse tipo de crescimento é localizado e autolimitante. (INCA., 2011). O crescimento celular não-controlado, o qual é denominado neoplasia, é caracterizado por massas de tecido de crescimento quase autônomo, se replicando mesmo após os estímulos que iniciaram seu crescimento cessarem. São denominados também tumores. (INCA., 2011)

Os tumores benignos apresentam limites bem definidos e crescimento organizado, geralmente lento e expansivo (figura 10). Suas células apresentam diferenciação evidente se parecendo com células saudáveis. Embora não invada tecidos adjacentes nem realize metástase, o tumor benigno pode esmagar órgãos, veias e artérias comprometendo a circulação e causando graves danos (INCA., 2011).

Tumores malignos são mais independentes, crescendo desordenadamente podendo invadir tecidos adjacentes, outros órgãos e sistemas do corpo através de um processo conhecido como metástase: a migração de células tumorais pela corrente sanguínea e/ou pelos vasos linfáticos. Esta forma extremamente perigosa é a que mais causa mortes (figura 10) (INCA., 2012).



-Figura 10 Diferença entre tumor maligno e benigno. fonte: Ilustração de Mariana F. Teles

A célula cancerígena é caracterizada pelo aumento da velocidade do ciclo celular, alterações genéticas, crescimento invasivo, quimiotaxia, aumento da mobilidade celular, mudanças na superfície celular e outros fatores. (BABA *et al.*, 2007)

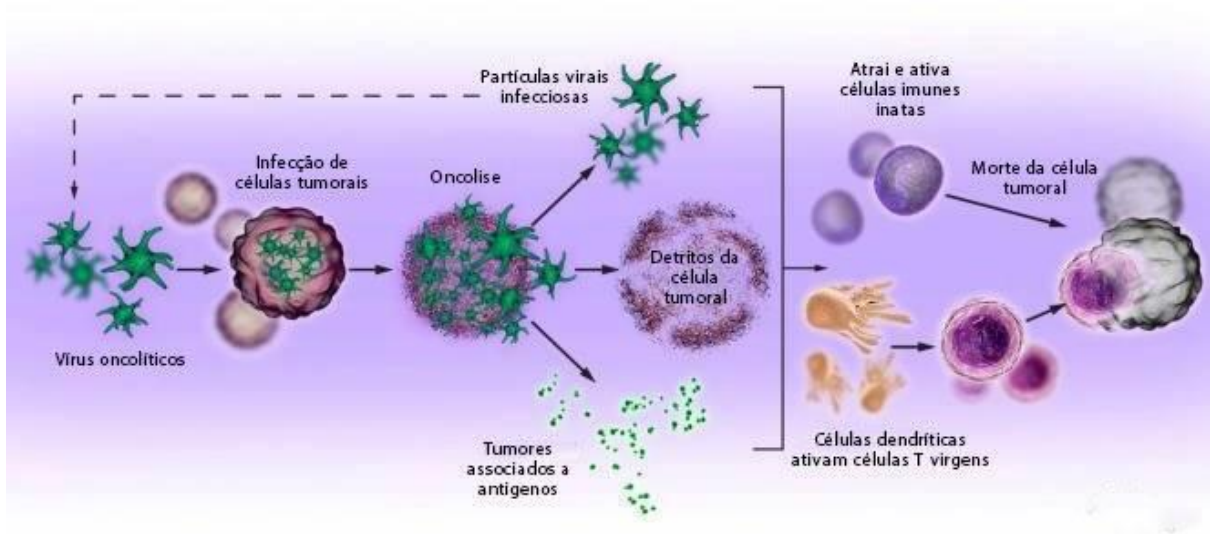
Uma característica notável é o aumento do núcleo celular e sua irregularidade. Há mudanças significativas no citoplasma que devido a um aumento anormal de ribossomos e RNA mensageiro se torna basófilo. O mesmo é geralmente menor do que o normal e repleto de vacúolos. (BABA *et al.*, 2007)

A membrana celular sofre mudanças significativas. Há diminuição ou aumento no número de receptores normais, assim como há o surgimento de novos receptores celulares. Estes podem atuar como epítomos e serem reconhecidos pelo sistema imunológico, entretanto, as mesmas possuem determinados mecanismos de escape ao sistema imunológico. (BABA *et al.*, 2007)

1.3-Sistema Imune e Viroterapia Oncolítica

A relação da viroterapia oncolítica com o sistema imunológico é de vital importância. O sistema imune apresenta uma relação dual com a viroterapia, ora atuando sinergicamente contra o alastramento tumoral, ora atuando contra a ação viral no organismo. (FILLEY *et al.*, 2017)

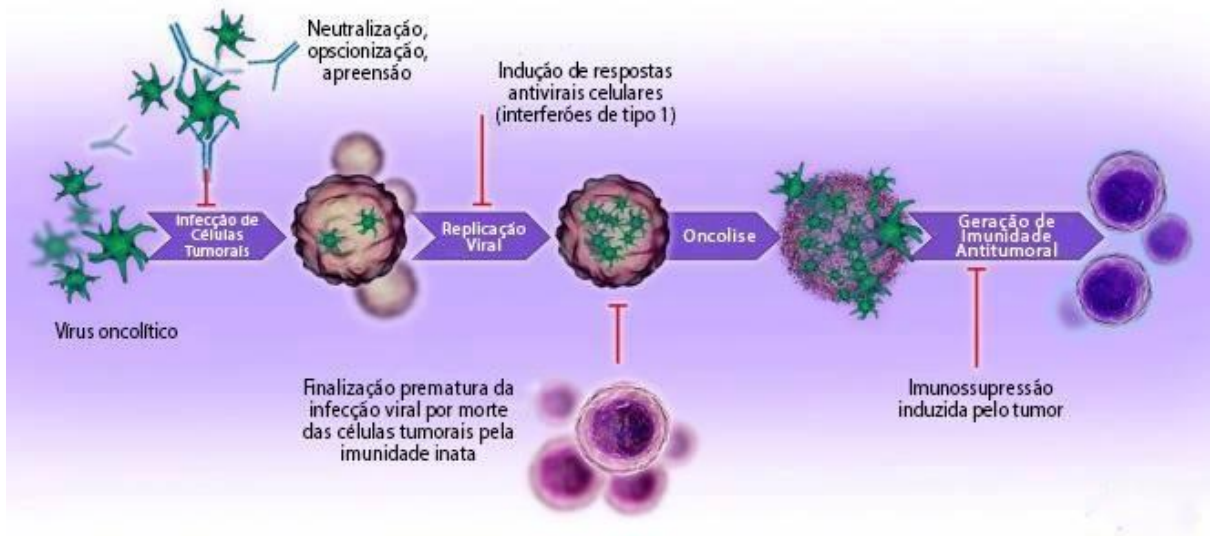
A resposta imune possui um papel crucial na ação do vírus ao tumor: seja gerando uma resposta inflamatória no local do tumor, atraindo células da imunidade inata para auxiliar na destruição das células tumorais, ou seja, liberando epítomos tumorais via morte celular para a ativação de células da imunidade adaptativa, gerando uma memória imunológica daquele tumor específico, levando aos linfócitos a atacarem outros locais de crescimento pelo corpo e impedindo o retorno do tumor (figura 11) (FILLEY *et al.*, 2017).



-Figura 11: Ação Sinérgica entre viroterapia e imunoterapia (C.M.Brown)

Os tumores são conhecidos por estimularem a liberação de imunossupressores como a Interleucina-10 e o fator de transformação de crescimento-B que causam imunossupressão, inibindo a resposta imune ao tumor. Indo na contramão, a infecção viral estimula a liberação de citocinas que estimulam a resposta imune (ex: IL-1, IL-6, IL-12, IL-18) e quimiocinas (ex: RAMTEC e MIP-10beta) estimulando uma reação inflamatória. (FILLEY *et al.*, 2017)

Entretanto, devido a esses efeitos inflamatórios, a viroterapia oncolítica pode ser tanto auxiliada quanto prejudicada. Se por um lado a inflamação auxilia na destruição de células tumorais, a resposta pode impedir que a infecção viral se alastre pelo tumor, encerrando o processo antes dele gerar danos mais significativos (figura 12) (FILLEY *et al.*, 2017)



-figura 12: Ação antagonista entre viroterapia e imunoterapia (Adaptado de C.M.Brown)

A oncolise pode ser impedida por diversos fatores, sendo eles relacionados a resposta humoral como a neutralização do vírus e sua opsonização, que é a ligação de anticorpos em epítomos específicos da partícula viral.(FILLEY *et al*, 2017) Isso acaba por inutilizar o vírus já que as funções daquele epítomo podem ser desativadas e o torna mais suscetível a ser fagocitado, já que células como macrófagos possuem receptores que facilitam sua capacidade fagocítica (TEVA *et al.*, 2010).

Ao ser opsonizado, o vírus pode ser mais facilmente sequestrado por células do sistema imune inato e destruído em locais como baço e fígado, além do interior das próprias células. A morte prematura da célula tumoral infectada por células do sistema imune também dificulta a infecção, pois assim a célula será destruída antes de poder espalhar as partículas virais para outras células (FILLEY *et al.*, 2017)

A detecção de partículas virais induz ao sistema imune a produzir proteínas anti-virais tais como o Interferon (INF-1) que tem como função a reprogramação da expressão gênica em células saudáveis e tumorais para impedir o alastramento da infecção. Sua liberação pode ter atuação sinérgica a viroterapia, mas também pode dificultar o progresso da infecção e o efeito citotóxico viral nas células infectadas (FILLEY *et al.*, 2017).

Para que a viroterapia oncolítica produza o máximo de resposta imune adaptativa possível, é necessário que a infecção progrida, ocorrendo o máximo de oncolises possíveis. A

oncolíse libera epítomos tumorais que são posteriormente apresentados aos linfócitos T gerando uma resposta imune adaptativa e uma memória imunológica a aquele tumor (FILLEY *et al.*, 2017).

Entretanto, devido a suas propriedades patogênicas, os vírus assim que entram no organismo são neutralizados pela resposta imune humoral ou estimulam as células da resposta imune inata a destruírem as células tumorais infectadas pelos vírus, evitando assim a oncolíse e posteriormente a formação de uma resposta imune adaptativa, limitando a ação da viroterapia (FILLEY *et al.*, 2017).

A técnica de modificação do capsídeo viral através da conjugação de polímeros como poliofileno glicol N2-[hidroxypropil]metacrilamida ou a enclausurassão por lipídeos pode proteger o vírus da neutralização pela imunidade humoral e a formação de anticorpos virais novos. (FILLEY *et al.*, 2017)

A utilização de imunodepressivos neste caso é útil para evitar que a resposta inata impeça o prosseguimento da infecção, garantindo assim que a oncolíse ocorra ao máximo. Pode ser feito inclusive com doses de quimioterápicos, que possuem efeitos imunodepressivos como efeito colateral de seu efeito citotóxico. (FILLEY *et al.*, 2017)

Testes clínicos têm demonstrado que a sinergia entre a quimioterapia e viroterapia é significativamente eficiente. Em um estudo realizado em humanos com o ONYX-015 (d11520), um adenovírus geneticamente modificado, junto de cisplatina e 5-fluorouracil em um total de 37 pacientes, foram observados resultados clínicos objetivos em 65% dos pacientes tratados com a quimioterapia e a viroterapia conjuntamente, excedendo os índices de resposta dos pacientes que receberam um ou outro tratamento ao invés de os dois (FR *et al.*, 2000 *apud* FILLEY *et al.*, 2017).

A liberação de epítomos tumorais na oncolíse gerada pela infecção nas células ativa os linfócitos TCD4+ que irão interagir com epítomos virais e neoplásicos expressos através de MHC nas células tumorais, matando-as por citotóxicidade. Em seguida os linfócitos TCD8+ são ativados, levando a produção de citocinas e quimioquinas que causarão uma resposta imune na área do tumor, gerando assim um aumento da destruição das células tumorais. Ao final, como possível modo de auto regulação, os linfócitos B produzem anticorpos antivirais, limitando a ação da infecção por neutralização viral (FILLEY *et al.*, 2017).

1.4-Introdução a história da técnica

Desde meados do século XIX, foi percebida clinicamente relações entre infecções e casos de recessões cancerígenas (KELLY *et al.*, 2007). A maioria desses pacientes era portador de alguma espécie de leucemia, câncer sanguíneo conhecido por comprometer o sistema imunológico. Um dos casos relatados é de uma mulher descrita com 42 anos chamada Dock (nome ilustrativo) a qual era portadora de Leucemia mieloide crônica. A mesma entrou em remissão ao contrair influenza, apresentando um baço e um fígado de tamanho avantajados, sintoma característico de leucemia, teve os mesmos diminuídos até seu tamanho normal. Sua contagem de leucócitos que estava anormalmente alta, como esperado em seu tipo de câncer, abaixou mais de 70 unidades após a infecção (KELLY *et al.*, 2007).

A ideia de se utilizar os vírus no tratamento de câncer se iniciou academicamente na década de 50, possibilitada pelo surgimento de sistemas de culturas de células neoplásicas e de biomodelos portadores de câncer (RUSSEL *et al.*, 2012). Centenas de pacientes foram tratados com culturas impuras de vírus, até mesmo a inoculação de fluidos contaminados. Geralmente esses vírus eram eliminados pelo sistema imune do paciente, não gerando efeitos significativo (RUSSEL *et al.*, 2012).

Entretanto, foi registrado na universidade de Okasa casos promissores de regressão tumoral causados por uma cepa de vírus da parotidite infecciosa (caxumba). A regressão foi registrada em 37 dos 90 pacientes de câncer terminal que foram tratados com a cepa não atenuada do vírus da parotidite infecciosa (RUSSEL *et al.*, 2012). Entretanto, a pesquisa não foi continuada na década de 70 e as cepas utilizadas no tratamento dos pacientes foram perdidas (RUSSEL *et al.*, 2012).

A retomada da viroterapia oncolítica pode ser associada a uma publicação de 1989 onde um vírus Herpes atenuado, Timidina Cinase (-) se mostrou ativo em um modelo de glioblastoma murino. (Russel *et al.*, 2017) O retorno da técnica de viroterapia oncolítica tornou-se possível devido aos adventos das técnicas de engenharia genética, as quais possibilitaram que o tropismo natural dos vírus fosse aprimorado (RUSSEL *et al.*, 2012).

Resultados dessas pesquisas, recentemente em 2015 foi aprovado pelo FDA (Food and Drugs Administrations) o T-VEC, um vírus Herpes Simples modificado. (RUSSEL *et al.*, 2017).

CAPITULO 2- DESENVOLVIMENTO DA VIROTERAPIA ONCOLÍTICA, T-VEC VÍRUS, OUTROS VÍRUS ONCOLÍTICOS E LIMITAÇÕES.

2.1-Desenvolvimento da Viroterapia Oncolítica

A viroterapia começou com observações na virada do século 19 para o século 20, onde eram registradas a correlação entre infecções e recidivas tumorais, principalmente em pacientes imunodeprimidos (KELLY and RUSSEL, 2009). Em 1949, 22 pacientes com a doença de Hodgking foram tratados com soro e tecidos contendo um dos tipos virais da hepatite. A partir dos anos 50 até os 80, foram realizados diversos experimentos de tratamentos para o câncer utilizando vírus silvestres ou naturalmente atenuados, muitas vezes inoculados de forma não adequada (HIROSHI *et al.*, 2017).

Hoje sabemos que a viroterapia tem como princípio a ausência de mecanismos protetores de infecções virais nas células cancerígenas, permitindo assim que os vírus se repliquem nesses tecidos de maneira muito mais rápida do que em um tecido saudável. O desafio então, não é como fazer os vírus atacarem células tumorais, e sim evitar que eles se repliquem em células saudáveis. A utilização de vírus não virulentos em humanos e a modificação genética são as apostas dadas pelos pesquisadores na área para resolver esta questão (HIROSHI *et al.*, 2017).

A viroterapia oncolítica moderna se desenvolveu a partir do início da década de 90, quando um estudo publicado com o HSV geneticamente modificado com uma deleção no gene precursor da Timidina Cinase testado em um modelo de enxerto de glioma humano mostrou resultados promissores. O artigo foi publicado na Science em 1989 pelo Doutor Robert Martuza e colaboradores, servindo de modelo para as experiências com vírus oncolíticos que se seguiram, principalmente os que utilizavam também o HSV com é o caso do T-VEC (HIROSHI *et al.*, 2017, CHRISTOS *et al.*, 2017 e RUSSEL *et al.*, 2017).

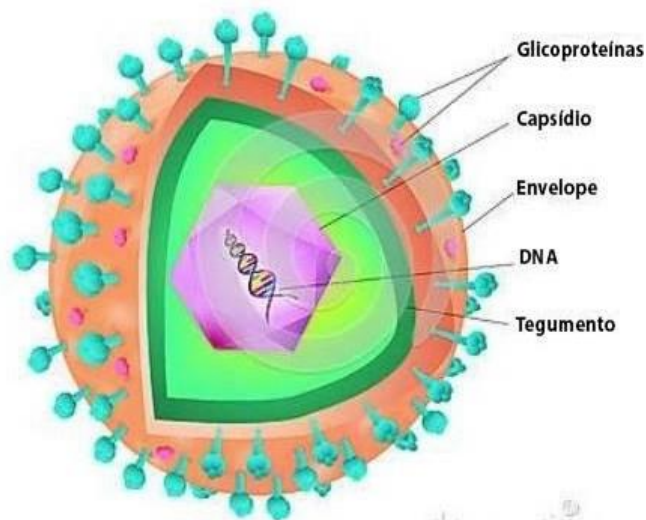
A partir deste estudo, novas portas na viroterapia se abriram com a possibilidade de modificar vírus geneticamente, melhorando seu tropismo por células tumorais. No momento há dois vírus oncolíticos aprovados como drogas comerciais, um deles é o H101, um adenovírus com uma deleção no gene *E1B*, aprovado em 2005 na China para a utilização em cânceres de cabeça e pescoço e de esôfago. Em 2015, nos EUA, em 2016 na Europa e na Austrália, o

JS1/ICP 34.5-/ICP47LGM-CSF ou T-VEC foi aprovado para a utilização em câncer de pele (melanoma) (HIROSHI *et al*, 2017, CHRISTOS *et a*, 2017 e RUSSEL *et al* 2017).

2.2-T-VEC

O T-VEC é um Herpes Simplex Vírus tipo 1. Os Herpes Vírus Simples, são vírus causadores da Herpes humana. Segundo o comitê internacional de taxonomia viral, fazem parte da ordem Herpesvirales, família Herpesvireadae e subfamília Alphaherpesvirinae. É um vírus dermo e neurotrópico, causa lesões nas membranas muco-cutâneas, orofaciais e genitais, podendo também causar lesões oculares e encefalite (SANTOS *et al.*, 2015).

VÍRUS DA HERPES



-Figura 13: Vírus da Herpes. Adaptado de **Accredited Global Congress on Bacteriology and Infectious Diseases**

Os HSV são assim como os outros Herpes vírus, vírus de DNA de fita dupla, envelopados com capsídeo icosaédrico tendo cerca de 162 capsômeros. Entre estas características, todos os membros desta família compartilham 4 características em comum, são elas: (1) A codificação de enzimas envolvidas no metabolismo de ácido nucleico (entre elas a Timidina-Cinase.), síntese de DNA viral e processamento de proteínas. (2) A síntese do DNA

viral ocorre no núcleo celular. (3) Causam lise celular. (4) Causam infecções persistentes, alguns entrando em estágio de latência (SANTOS *et al.*, 2015).

O vírus da Herpes Simples causa a doença popularmente conhecida como Herpes, característica por causar lesões na pele na região orofacial e/ou genital, se mantendo em estágio de latência com seu DNA integrado e em atividade silenciosa durante meses ou anos dentro de neurônios adjacentes aos tecidos infectados (SANTOS *et al.*, 2015).

O T-VEC contém duas deleções, uma no gene *y34.5* e outra no gene *a47*. O gene *y34.5* possui a função de inibir a célula hospedeira de impedir a síntese proteica viral durante uma infecção, como células tumorais não expressam esse gene, o vírus possui mais dificuldade de se replicar em células normais do que em células tumorais. Essa deleção também é importante por retirar o caráter neurotrópico do vírus. O gene *a47* é responsável por expressar proteínas que dificultam a apresentação de antígenos em células saudáveis, entretanto em células tumorais, esse gene deletado estimula a resposta imune ao tumor. Além disso, sua deleção acaba por ativar um gene vizinho chamado US11 que aumenta a replicação viral na célula hospedeira (HIROSHI *et al.*, 2017 e RUSSEL *et al.*, 2017).

Além disso há uma inserção do gene GM-CSF (granulocyte macrophage colony simulation fator), gene inserido no locus do gene *y34.5*. A inserção desse gene tinha por objetivo aumentar a resposta imune anti-tumoral, entretanto ainda não há evidências clínicas de que isso realmente aconteça em função deste fator (HIROSHI *et al.*, 2017).

A segurança do T-VEC foi testada em um estudo de fase I em pacientes com diversos cânceres metastáticos com o de mama, cabeça e pescoço, melanoma e gastrointestinal. De forma geral, a aplicação intralesional das cepas virais foram toleradas pelos pacientes. Nenhuma reversão foi observada, embora casos de estabilização tenham sido notados e as biopsias tumorais tenham diversas vezes demonstrado necropsia das células cancerígenas (HIROSHI *et al.*, 2017 e CHRISTOS *et al.*, 2017).

Uma fase II em 50 pacientes portadores de melanoma maligno demonstrou em um único estudo uma taxa de resposta de 26%, tanto em lesões que foram injetadas quanto nas que não foram injetadas o agente, incluindo lesões viscerais. Um aumento de linfócitos TCD8+ e a redução de TCD4+ e Fox P3+ células reguladoras foi constatada nas biopsias de regiões em que houve regressão tumoral. (HIROSHI *et al.*, 2017 e CHRISTOS *et al.*, 2017)

A fase III foi um teste randomizado envolvendo 436 pacientes na fase IIIB-IV de melanoma. Estes foram tratados aleatoriamente na proporção de 2:1 com aplicações

intralesionais de T-VEC e subcutâneas de GM-CSF (HIROSHI *et al.*, 2017 e CHRISTOS *et al.*, 2017).

Os resultados nos pacientes foram os seguintes:

- Mortes: Grupo do T-VEC (189); GM-CSF (109)
- Durabilidade da taxa de resposta (resposta efetiva em um período maior ou igual a 6 meses de tratamento): T-VEC (16,3%); GM-CSF (2,1%)
- Taxa de resposta geral: T-VEC (26,4%) GM-CSF (5,7%)
- Taxa de sobrevida: 23,3 meses (T-VEC) 18,9 meses (GM-CSF)

O aumento na taxa de sobrevida era muito mais significativo em pacientes nos quais o T-VEC era usado como a primeira linha de tratamento, provavelmente devido a ativação do sistema imune antitumoral dos pacientes. Devido a estes resultados promissores, o FAD de 2015 aprovou a utilização comercial do vírus para melanoma (FUKUHARA *et al.*, 2017 e CHRISTOS *et a.*, 2017).

2.3-Outros vírus oncolíticos

Embora o T-Vec tenha sido o primeiro aprovado para uso comercial nos EUA, Europa e Oceania, para viroterapia oncolítica existem diversos outros vírus sendo pesquisados e testados para a atuação em diversos tipos de câncer.

2.3.1 Vírus DNA

G47 Δ (HSV)

Este vírus foi produzido através de outro HSV-1, o G207. O vírus G47 Δ um vírus HSV-1 oncolítico de terceira geração. O G47 Δ foi formado introduzindo uma terceira deleção genoma do G207. Além de possuir as deleções nos genes *y34.5* e *a47*, mesmas que o T-Vec, o G47 Δ possui uma inserção do gene *LacZ* da Escherichea E-coli, gene este que acaba por desativar o gene *ICP6* (HIROSHI *et al.*, 2017).

O *ICP6* é um responsável por codificar uma grande subunidade da Ribonuclease Redutase (RR), enzima essencial para a síntese de DNA. Com isto, o G47 Δ apenas consegue

se replicar em células com um alto grau de RR para compensar a ausência de sua síntese por parte do DNA viral. Células tumorais devido a seu alto grau de replicação apresentam grande quantidade de RR, sendo assim o vírus possui mais um elemento que aumenta seu tropismo para células tumorais (HIROSHI *et al.*, 2017).

O G47 Δ tem se mostrado mais eficiente que o G207, sendo efetivo em praticamente todo tumor sólido *in vivo*. O mesmo já passou pelas fases I e II conduzidas em pacientes no Japão. Em 2016 foi considerado um “Sakitage” termo que indica “pronto para o mundo”, colocando o vírus mais próximo de ser aprovado para uso comercial (HIROSHI *et al.*, 2017).

JX-594 (Vaccinia Vírus)

O JX-594 é um Vaccinia Vírus geneticamente modificado, com uma mutação no gene que expressa a Timidina-Cinase, tornando-o mais seletivo em relação a células tumorais e a inserção do gene que expressa o *Granulocyt Macrophage Colony Stimulating Factor* (GM-CSF), aumentando a resposta imunológica tumoral. Além disso, há um gene LacZ utilizado como marcador (HIROSHI *et al.*, 2017 e CHRISTOS *et al.*, 2017).

É um vírus estável na corrente sanguínea, permitindo aplicações intravenosas, além de já ser amplamente estudado. Este vírus além disso possui uma grande citotoxicidade. (HIROSHI *et al.*, 2017 e CHRISTOS *et a.*, 2017).

Há resultados de fase I promissores em pacientes com Melanoma e hepatocarcinoma. Devido a sua estabilidade intravenosa o JX-594 tem se mostrado eficiente em tratamentos sistêmicos, sendo potencialmente eficiente contra câncer metastático (HIROSHI *et al.*, 2017 e CHRISTOS *et a.*, 2017).

CG0070 (Adenovírus)

Este Adenovírus foi modificado de forma que seu gene E1A e o GM-CSF inserido se tornam subordinados ao fator de transcrição E2F-1, regulado pelo retinoblastoma, proteína supressora tumoral. Em células com receptores anormais, as quais recebem menos Rb, característica de células tumorais, o E2F-1 é expresso, iniciando a transcrição do E1A e do GM-CSF. Isso potencializa o tropismo por células tumorais (HIROSHI *et al.*, 2017 e CHRISTOS *et al.*, 2017).

2.3.2 Vírus RNA

Reolysin (Reovírus)

Reovírus é um vírus RNA de fita dupla que preferencialmente se replica em células com alto grau de divisão celular. O Reolysin é um Reovírus não-modificado e não-patogênico extensivamente testado em modelos pré-clínicos e clínicos. O Reolysin atua oncoliticamente através de duas vias, a de apoptose e a de ativação do sistema imune, como outros vírus oncolíticos (HIROSHI *et al.*, 2017 e CHRISTOS *et al.*, 2017).

Cosxackie Virus (CXV)

Uma proteína chamada Decay-accelerating factor (DAF) possui a função de proteger a célula da ação do sistema complemento ou imunidade humoral. (BRODBECK *et al* 2000). Essa proteína é geralmente mais expressa em células tumorais, principalmente de melanoma. Quando essa proteína é combinada com a molécula de adesão intercelular-1 (MAI-1) é formando um complexo que serve de receptor para o CXV, formando assim nesta variedade um tropismo natural por células tumorais (CHRISTOS *et al.*, 2017).

Testes com o vírus tem se demonstrado promissores. Em um estudo de fase II com 57 pacientes, 40% deles em um período de 6 meses permaneceram vivos e livres da progressão da doença (CHRISTOS *et al.*, 2017).

Vírus do Sarampo (MV)

MV infecta células através de três vias: proteína H, CD46 e a molécula sinalizadora de linfócitos. A variedade silvestre do MV possui uma afinidade maior por MSF, entretanto, a cepa utilizada em vacinas possui uma afinidade maior por CD46, proteína altamente expressa em células tumorais. Assim, essa cepa possui um tropismo por células tumorais (CHRISTOS *et al.*, 2017).

. A fase I realizada em mulheres com câncer de ovário obteve sucesso em demonstrar a eficácia dessa cepa (CHRISTOS *et al.*, 2017).

2.4- Limitações da viroterapia oncolítica

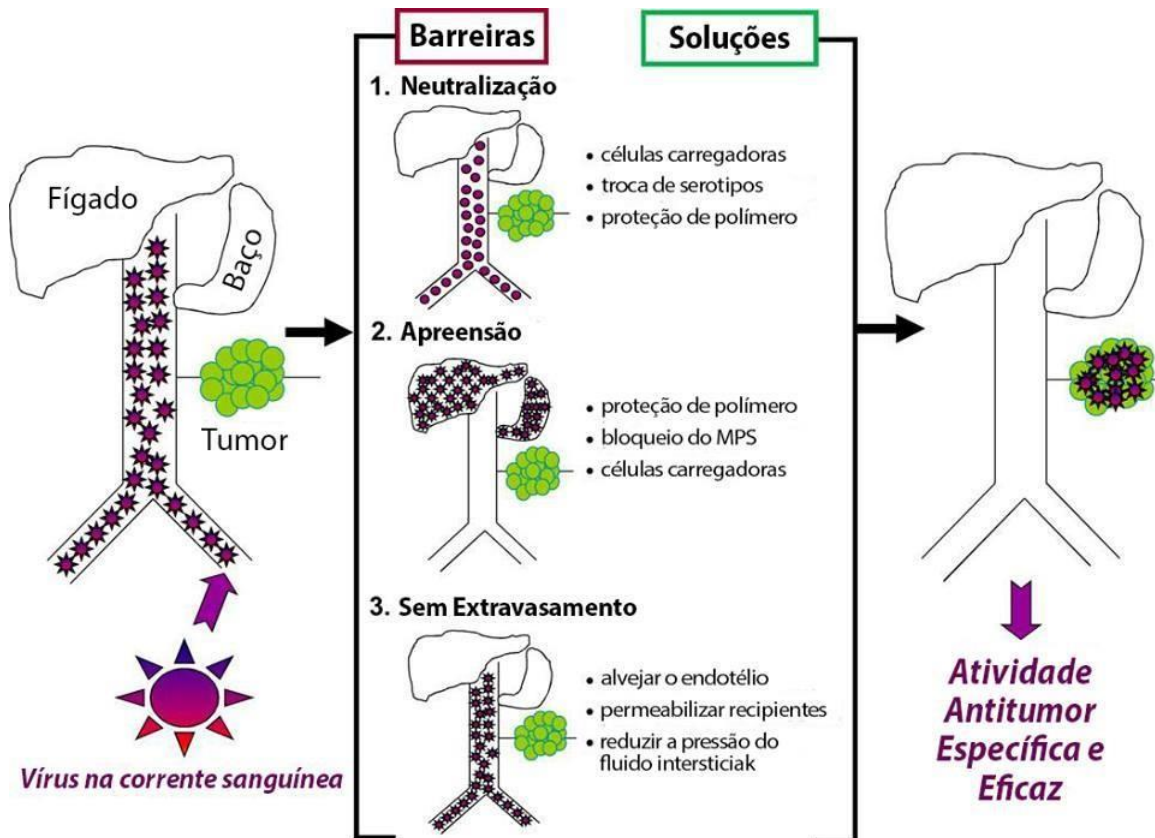
Há uma grande variedade de vírus oncolíticos sendo testados, muitos deles modificados para aprimorar o seu tropismo por células tumorais. Esses vírus compartilham muitas características com suas variedades silvestres, desde as positivas e até as negativas. Entre elas estão desde características específicas da espécie a características gerais aos vírus, as quais dificultam a ação oncolítica (HIROSHI *et al.*, 2017).

Como características específicas, temos por exemplo o caso do HSV-1, vírus predecessor do T-VEC e do G47 Δ . O HSV-1 se espalha de célula a célula, não causando viremia naturalmente, assim, aplicações intravenosas do vírus acabam sendo ineficientes, dando-se preferência para aplicações intralesionais. Isso acaba sendo compensado pela característica do T-VEC estimular uma resposta imune adaptativa, que acaba por atacar tumores localizados em outras partes do organismo, mesmo distantes da lesão e gerar uma imunidade a longo prazo (HIROSHI *et al.*, 2017).

Em quesitos gerais, a relação do sistema imune com os vírus como, já visto, apresenta pontos positivos e negativos. Embora a infecção viral possa estimular a resposta imune ao tumor, os vírus também estão suscetíveis de serem neutralizados pela ação imunológica (FILLEEY *et al.*, 2017).

Vírus na corrente sanguínea, por exemplo, são geralmente opscionizados por anticorpos, neutralizados pelos mesmos e pelo sistema complemento, sequestrados por células do sistema mononuclear de fagocitose (SMF), onde são destruídos no baço e no fígado (RUSSEL *et al.*, 2012).

Existem maneiras de se evitar esse tipo de problema (figura 14). A anexação de polímeros no capsídeo viral atua de forma a evitar a opscionização e a neutralização (RUSSEL *et al.*, 2012 e FILLEEY *et al.*, 2017). Saturar o SMF ou bloquear seus receptores ajuda a limitar o sequestro por parte dos mesmos. Outra técnica utilizada para evitar estes problemas é esconder o vírus oncolítico em uma célula carreadora, sendo utilizado ou uma célula tumoral cultivada *ex vivo* ou uma célula primária normal que pode também ir até o tumor (RUSSEL *et al.*, 2012).



-Figura 14: Problemas e soluções na aplicação viral (Adaptado de "ONCOLICTY VIROTHERAPY" Russel *et al.*,2014)

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A viroterapia oncolítica é uma técnica desenvolvida recentemente, porém estudada desde o século XIX, mas de forma efetiva a partir da década de 90. Essa técnica tem como princípio o tropismo viral por células tumorais, utilizando-se do aparato viral para destruir tumores e gerar uma resposta imune que auxilie no combate ao tumor.

De desafios encontrados no desenvolvimento da viroterapia oncolítica está a relação dos vírus com o sistema imune. O vírus como um corpo estranho ativa o sistema imunológico. Desde a resposta humoral que neutraliza o agente ou o vírus sendo destruído ainda na corrente sanguínea, até uma resposta que destrua a célula tumoral antes da infecção se espalhar.

Um dos maiores desafios para o prosseguimento da técnica então é como conciliar a viroterapia com a imunoterapia no combate ao câncer, já que horas parecem atuar sinergicamente e outras parecem se anular. Como possíveis soluções, há a utilização sinérgica de viroterapia e quimioterapia, já que a segunda é conhecida por diminuir a resposta imune, equilibrando a situação. A utilização de polímeros nos capsídeos e envelopes dos vírus utilizados para impedir o reconhecimento de sua superfície antígena pelo sistema imune, ou mesmo o carregamento dessas cepas por células.

Concluimos que com o avanço das técnicas em imunoterapia, quimioterapia e radioterapia, a viroterapia vem como mais um suplemento no combate ao câncer, que tem se mostrado através de experimentos como um tratamento viável. Esperamos que conforme a tecnologia avance, haja uma maior compreensão do funcionamento da terapia, recursos e disponibilidade de mais dados em pacientes, tornando assim a viroterapia oncolítica em uma técnica viável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BABA AL, Catoi C. *Comparative Oncology – Chapter 3: Tumor Cell Morphology*. Acesso em 14 de dez. de 2018.

BRODBECK, W. G.; KUTTNER-KOND, L.; MOLD, C. MEDOF, M. E. *Structure/function studies of human decay-accelerating factor*. Revista: **Immunology** Acesso em 14 de dez. de 2018.

CHRISTOS, Fountzilias; SUKESHI, Patel; MAHALINGAM, Devalingam. *Review: Oncolytic virotherapy, updates and future directions*. Revista: **Oncotarget** Acesso em 14 de dez. de 2018.

FILLEY, Anna C.; DEY, Mahua. *Immune System, Friend or For of Oncolytic Virotherapy?* Revista: **Frontiers in oncology**. Acesso em 14 de dez. de 2018.

HARRINGTON, K. J.; PUZANOV, I.; HECHT, J. R.; HODI, F. S.; SZABO, Z.; MURUGAPPAN, S.; KAUFMAN, H. L. *Clinical development of talimogene laherparepvec (T-VEC): a modified herpes simplex virus type-1-derived oncolytic immunotherapy*. Revista: **Expert Review of anticancer therapy**. Acesso em 14 de dez. de 2018.

HIROSHI, Fukuhara; INO, Yasushi; TODO, Tomoki. *Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn*. Revista: **Cancer Science** Acesso em 14 de dez. de 2018.

HOWELLS, Anwen; MARELLI, Giulia; LEMOINE, Nicholas R.; WANG, Yaohe. *Oncolytic Viruses – Interaction of Virus and Tumor Cells in the Battle to Eliminate Cancer*. Revista: **Frontiers in Oncology**. Acesso em 14 de dez. de 2018.

INCA. **ABC do Câncer**. Serviço de Edição e informação técnico científico. Rio de Janeiro-RJ. 2011

KELLY, Elizabeth; RUSSELL, Stephen J. *History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering*. Revista: **Molecular Therapy**. Acesso em 14 de dez. de 2018.

RUSSELL, Stephen J.; PENG, Kah-Whye. *Oncolytic Virotherapy: A Contest between Apples and Oranges*. Revista: **Molecular Therapy** Acesso em 14 de dez. de 2018. (Publicado em 2017)

RUSSELL, Stephen J.; PENG, Kah-Whye; BELL, John C. *Oncolytic Virotherapy*. Revista: **Nature biotechnology**. Acesso em 14 de dez. de 2018. (Publicado em 2012)

SANTOS. N.S de O, ROMANOS. M.T.V, WIGG.M.D. **Virologia Humana**. Rio de Janeiro-RJ. Edt Guanabara Koogan LTDA. 3ª edição. 2015

STPHENS. P.R.S *et al*. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. In: Capítulo 2, **Virologia**. Rio de Janeiro-RJ. Escola Politécnica Joaquim Venâncio. Biblioteca Emília Bustamante. 2010.