

Déborah Behr de Faria

**UTILIZAÇÃO DE POXVÍRUS ONCOLÍTICOS COMO FERRAMENTA
TERAPÊUTICA CONTRA O CANCER**

Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2010

Déborah Behr de Faria

**UTILIZAÇÃO DE POXVÍRUS ONCOLÍTICOS NO TRATAMENTO CONTRA O
CANCER**

Monografia apresentada ao Curso de
Especialização em Microbiologia como
parte dos requisitos necessários para
obtenção do Título de Especialista em
Microbiologia

Orientador: Prof. Flávio Guimarães Fonseca

Belo Horizonte
2010

RESUMO

A ideia de se utilizar vírus para o tratamento de câncer humano é datada de 1912, apenas 14 anos após a descoberta do primeiro vírus. Após 100 anos, com os avanços da biologia molecular e o conhecimento em virologia aumentaram a possibilidade de utilizar este parasita para combater malignidades humanas. O *Vaccinia virus*, grande responsável pela imunização contra a varíola desempenha papel importante nas promissoras viroterapias de combate ao câncer. Devido ao seu enorme genoma, amplo tropismo, alta imunogenicidade e potencial lítico pode ser utilizado para carrear e expressar antígenos associados ao tumor e moléculas imunomodulatórias, além de infectar, multiplicar e lisar células cancerígenas.

Palavras-chave: *poxvirus*, *oncolytic* e cancer

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	3
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
2.1	POXVÍRUS.....	10
2.2	VÍRUS ONCOLÍTICOS.....	15
2.3	VACCINIA VIRUS ONCOLÍTICO	21
3	JUSTIFICATIVA.....	22
4	OBJETIVO	23
5	METODOLOGIA	24
6	DISCUSSÃO.....	25
7	CONCLUSÃO	28
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um problema de saúde pública que tem aumentando tanto a incidência quanto a mortalidade no Brasil, sendo uma das principais doenças que causam morte em todo o mundo. Embora tenha acontecido um grande progresso em diversas áreas, como etiologia do câncer, técnicas diagnósticas e prevenção, terapias efetivas ainda não foram descobertas e aplicadas em larga escala (STEELE, 2000).

Segundo recente relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/OMS (*World Cancer Report 2008*), o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos. Estimou-se que, no ano de 2008, ocorreriam cerca de 12 milhões de casos novos de câncer e 7 milhões de óbitos. O contínuo crescimento populacional, bem como seu envelhecimento, afetará de forma significativa o impacto do câncer no mundo. Esse impacto recairá principalmente sobre os países de médio e baixo desenvolvimento. A IARC/OMS estimou que, em 2008, metade dos casos novos e cerca de dois terços dos óbitos por câncer ocorrerão nessas localidades (INCA, 2010).

Neste cenário, torna-se fundamental que os recursos e esforços sejam direcionados no sentido de orientar as estratégias de prevenção e controle de câncer. O estabelecimento de medidas efetivas para o controle do câncer pressupõe informações de qualidade sobre a distribuição de incidência e mortalidade, possibilitando assim melhor compreensão sobre a doença e seus determinantes; formulação de hipóteses causais; avaliação dos avanços tecnológicos aplicados à prevenção e tratamento, bem como a efetividade da atenção à saúde. Um sistema de vigilância estruturado fornece informações sobre a magnitude e o impacto do câncer, como também sobre a efetividade de programas de controle de câncer, bem como a avaliação de seu desempenho. Os registros de câncer (de base populacional e hospitalares) são parte desse sistema de vigilância (INCA, 2010).

Em 2008, a IARC/OMS estimou que ocorreriam 12,4 milhões de casos novos e 7,6 milhões de óbitos por câncer no mundo. Destes, os mais incidentes

foram o câncer de pulmão (1,52 milhões de casos novos), mama (1,29 milhões) e cólon e reto (1,15 milhões). Devido ao mau prognóstico, o câncer de pulmão foi a principal causa de morte (1,31 milhões), seguido pelo câncer de estômago (780 mil óbitos) e pelo câncer de fígado (699 mil óbitos). Para América do Sul, Central e Caribe, estimou-se em 2008 cerca de um milhão de casos novos de câncer e 589 mil óbitos. Em homens, o mais comum foi o câncer de próstata, seguido por pulmão, estômago e cólon e reto. Nas mulheres, o mais frequente foi o câncer de mama, seguido do colo do útero, cólon e reto, estômago e pulmão (WORLD CANCER REPORT, 2008).

No Brasil, as estimativas, para o ano de 2010, serão válidas também para o ano de 2011, e apontam para a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada para a América Latina (INCA, 2010).

Um dos tratamentos utilizados para o câncer são as chamadas imunoterapias, que utilizam-se de agentes biológicos que modificam as respostas biológicas do hospedeiro contra o câncer, contudo em alguns casos, elas podem causar citotoxicidade direta. Geralmente, os agentes biológicos, tais como interleucinas, interferons, imunoglobulinas e fatores de crescimento hematopoiético, demonstram uma atividade máxima dentro de uma estreita faixa de concentração, e concentrações mais elevadas ou mais baixas podem resultar em um efeito sub-ótimo. Desta forma, a dose clínica ideal é aquela que produz o efeito máximo desejado sem causar toxicidade (OLD, 1996).

Estudos realizados em animais, concluíram que o sistema imune pode identificar e eliminar tumores, sendo essa rejeição de células tumorais mediada, principalmente por linfócitos citotóxicos, inclusive por linfócitos T citotóxicos e as células *natural killer*, podendo participar também outras células efetoras, tais como células T auxiliares, linfócitos B e macrófagos. Contudo em pacientes com câncer, essas respostas imunes antitumorais não tem sido identificadas com tanta facilidade, além disso a identificação imune das células malignas pode não resultar em rejeição do tumor (OLD, 1996).

A utilização da imunoterapia para o câncer busca evocar respostas imunes efetivas contra tumores humanos, e se baseiam-se de três estratégias: imunoterapias não-específicas, que estimulam a resposta imune local ou sistêmica, através da produção de citocinas e moléculas co-estimuladoras; e imunoterapias antígeno-específicas, que incluem o transporte de antígenos tumorais e transferências de células T ativadas por antígenos tumorais específicos através de vetores, que podem ser vírus, plasmídeos, lipossomos, e terapias que envolvem células dendríticas com a finalidade de estimular e facilitar o reconhecimento pelo sistema imune daquele alvo específico (SHEN e NEMUNAITIS, 2005).

Algumas das abordagens da imunoterapia não-específica já realizadas são: administração de anticorpos monoclonais, citocinas imunomoduladoras e células imunocompetentes autólogas (OLD, 1996).

A possibilidade de produção de anticorpos monoclonais contra um antígeno específico gerou grandes expectativas no seu uso na terapia do câncer, mas a dificuldade em definir sorologicamente antígenos específicos para os tumores, a modulação antigênica pelas células tumorais e o desenvolvimento de anticorpos humanos anticamundongo deixou esta terapia no campo da investigação sendo mais comumente utilizada para o diagnóstico propriamente dito do câncer, como na imunofenotipagem das leucemias e linfomas por meio de anticorpos monoclonais ou então na monitoração do câncer de próstata através do antígeno prostático específico (OLD, 1996).

Os interferons e as interleucinas exercem efeitos imunomodulatórios. Os interferons do tipo I (tais como interferons α e β) exercem efeitos imunorregulatórios e antiproliferativos, sendo o interferon α já utilizado no tratamento de leucemias e sarcoma de Kaposi ligado à AIDS e o interferon β possui atividade no linfoma não Hodgkin de baixo grau, mieloma múltiplo e carcinoma de células renais. Já o interferon do tipo II, o interferon γ , parece ter menor atividade antitumoral como agente isolado em comparações com os interferons do tipo I. Dentre as interleucinas, que são moléculas mensageiras, apenas a interleucina 2 recombinante foi comprovada como agente neoplásico. Esta interleucina é um hormônio regulador fundamental na imunidade mediada

por células, estimulando a proliferação e atividade citolítica dos linfócitos T e das células *natural killers*. Desta forma, terapia com altas doses de interleucina 2 produz uma resposta imune em pacientes com melanoma e carcinoma metastático de células renais (OLD, 1996).

As células imunocompetentes autólogas são células que foram ativadas e expandidas “*ex vivo*” antes de sua administração e normalmente são geradas em culturas de linfócitos do sangue periférico suplementadas com IL-2, podendo lisar diretamente células de tumores sólidos recém isoladas (OLD, 1996).

Uma linha promissora de investigação é a utilização de vírus como terapia para o câncer, que utiliza *Retrovirus*, *Adenovirus* e *Poxvirus* na estimulação do sistema imune de defesa, não só eliminando as células cancerígenas como estabelecendo uma resposta de memória contra o tumor (SHEN, NEMUNAITIS, 2005).

As células tumorais e seus antígenos específicos são freqüentemente ignorados pelo sistema imune do hospedeiro, seja porque o sistema MHC I está suprimido nestas células ou por falta de anticorpos específicos para esses antígenos. Uma estratégia que está sendo utilizada para ajudar o sistema imune a combater essas células é a expressão de genes tumorais por vetores virais. Os vírus utilizados são altamente imunogênicos, sendo capazes de induzir uma forte resposta imune humoral e celular (SHEN e NEMUNAITIS, 2005).

A utilização de vírus oncolíticos constitui uma das estratégias mais inovadoras para eliminar ou reverter o desenvolvimento de um tumor no organismo. Os vírus oncolíticos são aqueles somente se multiplicam em células tumorais, desta forma, uma vez inseridos em um tumor, os vírus se multiplicarão nas células tumorais, lisando-as e gerando novos vírus, os quais por sua vez infectarão outras células tumorais circundantes e assim sucessivamente, até que todas elas sejam eliminadas (LEE *et al.*, 2010).

A viroterapia oncolítica têm demonstrado ser multimodal nos mecanismos antitumorais em estudos pré-clínicos e clínicos. Comparada com a imunoterapia convencional, os vírus oncolíticos possuem a vantagem de ser citoreductor, e simultaneamente, conferir imunidade anticâncer específica. Adicionalmente, os vírus oncolíticos podem ter genes imunossupressores removidos de seu genoma, o que garante seu melhor funcionamento como imunógeno e a inserção de transgenes tumorais que irão aumentar a imunidade antitumoral (LI, *et. al*, 2008).

Dentre os vírus oncolíticos, os poxvírus são mais utilizados na terapia contra o câncer pois podem incorporar material genético exógeno com até 25Kb no genoma; são relativamente independente das enzimas do hospedeiro; possuem amplo tropismo, replicação em diferentes tipos de células; alta imunogenicidade, ativando a resposta das células T citotóxicas e natural killer e intenso potencial lítico (SHEN e NEMUNAITIS, 2005).

Os poxvírus são vírus complexos, com aproximadamente 200nm de diâmetro longitudinal, envelopados, com um genoma constituído por DNA dupla-fita que abriga muitos genes imuno-modulatórios, sendo aquele mais freqüentemente utilizado na terapia contra o câncer o *vaccinia vírus* (KOSKELA *et al.*, 2007).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O câncer é a principal causa de morte e vem aumentando a incidência e a mortalidade devido ao envelhecimento da população. Embora os tratamentos convencionais (cirurgias, radioterapias e quimioterapias) tenham impacto significativo na sobrevida global e na qualidade de vida dos pacientes, a maioria dos tipos de câncer permanece incurável e intratável. Vacinas terapêuticas contra o câncer estão surgindo recentemente e prometem ser o novo tratamento para o câncer. Imunizações passivas utilizando anticorpos terapêuticos contra antígenos associados ao tumor têm demonstrado prolongamento da sobrevida dos pacientes em certos tumores sólidos e leucemias, principalmente quando associadas aos tratamentos convencionais (LI, et. al, 2008).

As principais vantagens das vacinas contra o câncer em relação aos tratamentos convencionais seriam: alta especificidade do alvo (que seriam os antígenos associados ao tumor) e desta maneira, uma melhor margem de segurança dos efeitos colaterais; efeitos prolongados devido a resposta imune de memória que preveniria a recidiva e metástases. Entretanto, algumas modificações genéticas e imunomodulatórias ainda devem ser feitas para prevenir determinados problemas, tais como: resposta pouco eficaz diante de tumores volumosos requerendo assim associação com os tratamentos convencionais de citoredução a fim de diminuir o tamanho do tumor; o fato de que antígenos associados ao tumor são imunógenos fracos, pois são antígenos próprios; e evasão celular cancerígena do sistema imune devido às instabilidades genéticas e as quedas de imunidade antitumoral. O balanço entre o crescimento do tumor e a magnitude da resposta antitumoral proveniente da vacina terapêutica contra o câncer determinará a eficácia desta vacinas (LI, et. al, 2008).

A atividade anti-câncer de vírus já foi descrita ao longo do século vinte, sendo muitos experimentos realizados entre os anos de 1950 e 1960. A constatação de que alguns vírus de ciclo lítico apresentam propriedades seletivas de propagar e infectar tumores, deixando tecidos saudáveis ilesos, originou o conceito de vírus oncolíticos (WORSCHER et al., 2009). O

desenvolvimento da engenharia genética e da biologia molecular auxiliou pesquisas envolvendo vírus com propriedades oncolíticas e antitumorais nos últimos 15 anos, aumentando o número de estudos em fases pré-clínica e clínica com resultados preliminares promissores (KOSKELA et al., 2007). Evidências sugerem que a terapia oncolítica viral será utilizada adicionalmente à resposta imune do hospedeiro, sendo esta última, fator crítico para o sucesso da terapia viral oncolítica (WORSCHKECH et al., 2009).

2.1 POXVÍRUS

A família *Poxviridae* compreende um grande grupo de vírus que podem infectar uma grande variedade de vertebrados como também invertebrados. Os membros dessa família são caracterizados por possuírem um grande genoma de DNA dupla fita, replicação viral no citoplasma e uma complexa morfologia do virion (CONDIT, et al., 2006).

A família *Poxviridae* está subdividida em duas grandes subfamílias com base no tipo de hospedeiro, e as subfamílias estão, por sua vez, subdivididas em gêneros, diferenciados pela presença de antígenos específicos comuns. A subfamília *Chordopoxvirinae* que infectam vertebrados possui nove gêneros: *Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Cervidpoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Molluscipoxvirus*, *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Yatapoxvirus*. E a subfamília *Entomopoxvirinae* possui três gêneros, que são: *Alphaentomopoxvirus*, *Betaentomopoxvirus*, *Gammaentomopoxvirus* e infectam invertebrados. As relações entre os diferentes poxvírus de um mesmo gênero, já foram demonstradas através de análises imunológicas, dos polipeptídios e, mais recentemente, pelo seqüenciamento do genoma (ICTV, 2009).

O protótipo da família *Poxviridae* é o *Vaccinia virus* (VACV) pertencente à subfamília *Chordopoxvirinae*, gênero *Orthopoxvirus*, no qual o vírus da varíola é, clinicamente, o mais importante. A doença foi erradicada em 1980 graças à campanha mundial de vacinação, utilizando amostras pouco virulentas do *Vaccinia virus* como vacina. O genoma do *Vaccinia virus* tem um tamanho de aproximadamente 200kb, possuindo 200 genes e devido seu sítio de replicação ser o citoplasma, seu RNA mensageiro não possui introns, otimizando a tradução da seqüência genômica (CONDIT, et al., 2006).

O *Vaccinia virus* tem sido utilizado como vetor molecular, carreando genes codificadores de proteínas de outros vírus para a construção de vacinas experimentais, pois é altamente imunogênico e algumas amostras mais atenuadas não provocam malefício à saúde humana (MADIGAN, et. al, 2008). Outras características dos poxvírus atrativas para o desenvolvimento de sistemas virais carreadores de antígenos incluem: a capacidade de carrear até

25kb de DNA recombinante, controle preciso da expressão do gene alvo, ausência de integração genômica com hospedeiro, amplo tropismo, alta imunogenicidade, ausência de interferência na apresentação do antígeno pela célula hospedeira e a facilidade de produzir uma vacina ou vetor (MEYER, 2008).

Em 1982, foi mostrado pela primeira vez, que genes codificadores de proteínas imunogênicas poderiam ser inseridos em um *Vaccinia virus* sem este perder a habilidade de multiplicar em uma cultura de células *in vitro*. Uma vez inoculados em células, estes vírus recombinantes eram capazes de expressar o transgene. Assim, conseqüentemente, os animais infectados por estes vírus recombinantes eram capazes de gerar resposta imunológica contra a proteína em questão e, possivelmente, se tornavam protegidos contra infecções causadas pelo agente etiológico que codifica originalmente o gene inserido no vetor viral (MEYER, 2008).

O *Vaccinia virus* possui uma complexa morfogênese que culmina na formação de dois distintos virions que são envolvidos por diferentes números de membranas. O primeiro virion infeccioso que é produzido, chamado vírus maduro intracelular (IMV), é envolvido por uma simples membrana que o protege até a lise celular. O outro virion é coberto por uma segunda membrana, e este é chamado de vírus envelopado associado a célula (CEV) se estiver retido na superfície celular ou vírus extracelular envelopado (EEV) se estiver fora da superfície celular.

O mecanismo de formação dessas membranas ainda é muito discutido, o que já está claro é que diferentes proteínas virais constituem essas membranas, o que faz com que elas se tornem estruturalmente, funcionalmente e antigenicamente diferentes. As formas virais, CEV e EEV são importantes para a disseminação viral, sendo que o CEV induz a formação de caudas de actina da superfície celular, os quais conduzirão os virions para células não infectadas, já o EEV, *in vitro*, estão relacionados a disseminação a longa distância, acredita-se que no hospedeiro também. Adicionalmente ao papel de disseminação, esses virions, CEV e EEV, ajudam a evadir dos anticorpos e do sistema complemento do hospedeiro, já que o vírus estará

envolvido por uma membrana derivada do hospedeiro (ROBERTS e SMITH 2008).

Os Poxvírus possuem uma característica bioquímica única aos vírus de DNA, que é a replicação no citoplasma da célula do hospedeiro, onde os vírus codificam a maioria das funções necessárias, incluindo a maquinaria enzimática para a replicação do DNA e para o metabolismo do RNA. A pequena interação, em comparação com outros vírus, com as proteínas do hospedeiro permite a replicação em diferentes tipos de células e o escape dos mecanismos de defesa deste (SHEN, NEUMUNAITIS, 2005).

O ciclo de multiplicação viral dos poxvírus está exemplificado na figura 1 e se inicia com a ligação dos virions e entrada a uma célula hospedeira susceptível, na qual há a perda da membrana expondo o cerne viral que é transportado por microtúbulos para o interior da célula. A transcrição precoce de RNA mensageiros leva ao desnudamento do cerne e a replicação do DNA. Em regiões específicas da célula denominadas fábricas virais, virions imaturos (IV) são montados para formarem o vírus maduro intracelular, os quais em sua maioria são liberados para o exterior pela lise celular. Alguns são transportados para retículo endoplasmático e complexo de Golgi, onde serão envolvidos por uma membrana dupla e formarão os vírus intracelulares envelopados (IEV) que serão transportados pelos microtúbulos até a superfície celular. Então a membrana externa se fundirá com a membrana celular e irá expor o CEV na superfície da célula. A polimerização de caudas de actina poderá ocorrer para direcionar o vírus (CEV) para uma célula vizinha ou então o vírus é liberado como um EEV (ROBERTS e SMITH 2008).

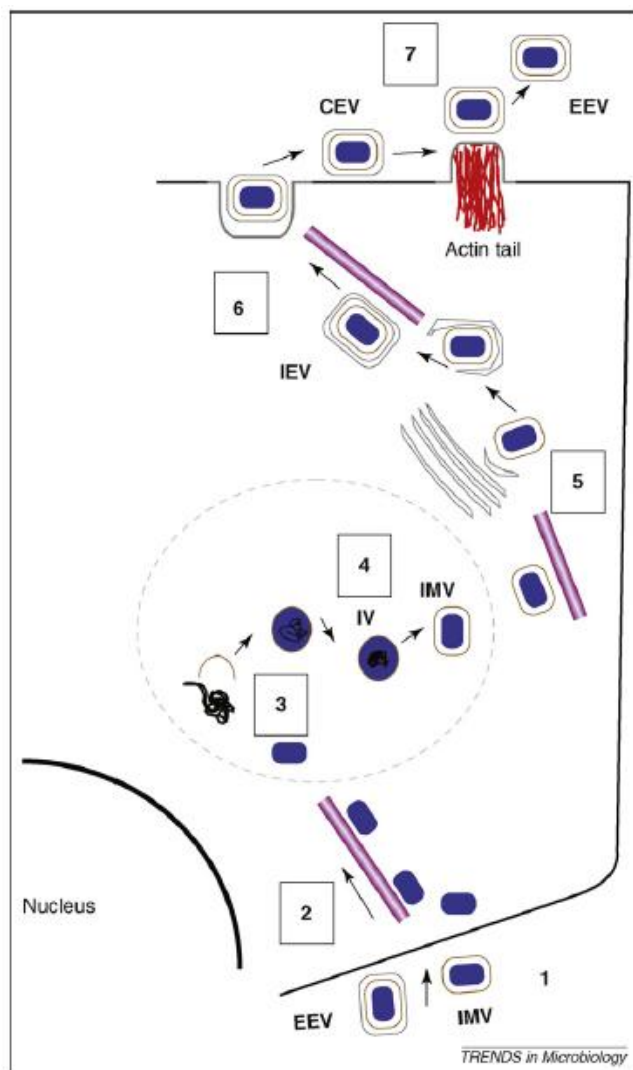


Figura 1: Etapas da morfogênese viral de um Vaccinia virus. (1) Ligação e entrada do vírus na célula hospedeira susceptível. (2) Transporte do cerne viral por microtúbulos para o interior da célula. (3) Transcrição precoce de RNA mensageiros a replicação do DNA. (4) Montagem dos vírus maduro intracelular (IMV) a partir de vírions imaturos (IV). (5) Transporte para retículo endoplasmático e complexo de Golgi, para formação dos vírus intracelulares envelopados (IEV). (6) Transporte pelos microtúbulos até a superfície celular. (7) Fusão da membrana externa com a membrana celular e exposição do vírus envelopado associado a célula (CEV) na superfície da célula. A polimerização de caudas de actina poderá ocorrer para direcionar o vírus (CEV) para uma célula vizinha ou então o vírus é liberado como um EEV (ROBERTS e SMITH 2008).

Outro poxvírus que já foi testado como vírus oncolíticos é o *Mixoma virus*, o qual é normalmente restrito a células não-humanas mas se replica

muito bem em células tumorais (MEYER, 2008). O *Myxoma virus* causa a doença letal myxomatosis em coelho, sendo não patogênica para todas as outras espécies de vertebrados, inclusive os humanos.

2.2 VÍRUS ONCOLÍTICOS

A viroterapia oncolítica é uma bioterapia emergente baseada na engenharia genética dos vírus, os quais são capazes de infectar e multiplicar seletivamente em células cancerosas. Embora o Vaccinia vírus não tenha mostrado preferência na infecção de células transformadas, muitos estudos vêm demonstrando um aumento nos níveis de multiplicação em tumores, assim como amostras de vaccínia com deleções nos genes codificadores da timidina quinase e do fator de crescimento, que multiplicam de modo eficiente em células de rápido crescimento (tumoriais). O *Vaccinia vírus* possui muitas das características necessárias para um vírus oncolítico efetivo, tais como: ciclo de vida curto, propagação rápida, habilidade lítica forte e uma biologia molecular praticamente definida (MEYER, 2008).

A possibilidade de incorporação de material genético exógeno com até 25Kb no genoma dos poxvírus é uma das maiores vantagens para este ser utilizado como vetor oncolítico, pois estes genes exógenos serão moduladores da função oncolítica “in situ” dos vírus. Além de induzir a lise celular, poderão ativar resposta das células T citotóxicas e natural killer (WORSCHER et al., 2009).

Os vírus oncolíticos matam as células cancerígenas através de um mecanismo de ação que envolve apoptose e necrose celular. A multiplicação seletiva intratumoral dos vírus oncolíticos leva à multiplicação, lise da célula cancerígena infectada e propagação viral para as células adjacentes e distantes do tumor. Essa terapia pode matar células tumorais através de mecanismos adicionais, incluindo indução de linfócitos T tumor-específicos e expressão de produtos terapêuticos a partir de transgenes, agindo cooperativamente até que as células tumorais sejam eliminadas (LEE et al., 2010).

Uma grande variedade de vírus tem demonstrado características oncolíticas, dentre eles estão os *adenovirus*, *herpes simplex virus*, *reovirus*, entre outros. Os vírus oncolíticos são capazes de replicar e destruir especificamente células tumorais, e essas propriedades podem ser inerentes

ou adquiridas através de engenharia genética. Inerentemente, vírus podem ser tumor seletivos, pois utilizam-se do mesmo mecanismo celular alterado que ocorre nas células cancerosas, tais como receptores de aderência ou via defectiva do interferon, como por exemplo, *Reovirus* e *Vaccinia virus*. Por engenharia genética, os vírus podem ter um gene específico removido, tais como genes que são cruciais para a sobrevivência em células normais, mas não em células tumorais. Alguns exemplos desses genes são: genes que codificam a timidina quinase, enzima necessária para a biossíntese da timidina, resultando em dependência do vírus na expressão celular de timidina quinase que estará sendo altamente expressada em células tumorais e pouco em células normais. Outra ferramenta que confere especificidade tumoral é restringir a multiplicação viral na dependência de atividades constitutivas em tumores, isto pode ser alcançado inserindo um promotor tumor-específico que direciona a expressão de um gene crítico (WONG, 2010).

Recentemente, o silenciamento gênico através de RNA de interferência está sendo utilizado para conferir seletividade tumoral. Micro RNAs ou pequenos RNA de interferência podem regular a expressão gênica pós-transcricional, bloqueando a tradução ou dificultando a expressão de genes específicos. Por exemplo, a inserção de sequências complementares a genes virais essenciais sob controle de um promotor responsivo a um fator de transcrição existente apenas em células normais (e não em células tumorais) faz com que os genes essenciais virais sejam silenciados, impedindo a replicação viral. Em células tumorais, onde o fator de transcrição não existe, o silenciamento dos genes essenciais não ocorre e o vírus se multiplica normalmente, matando a célula tumoral (WONG, 2010).

Os vírus são naturalmente maiores do que os outros agentes anti-câncer, tais como químicos e anticorpos. Deste modo, após a injeção intratumoral, os vírus podem ser barrados pela matriz extracelular, áreas de fibrose e necrose ou por células vizinhas ao tumor. Pesquisadores descobriram que componentes extracelulares, como colágeno e mucina podem restringir a infecção normal do HSV-1 no cólon, mas no carcinoma essas moléculas são produzidas em quantidades menores o que facilita a entrada viral (KOLODKIN-

GAL, et al. 2008). Ganesh (2008) co-administraram a enzima hialuronidase em uma injeção intratumoral com vírus oncolíticos, esta degradou a maioria dos constituintes da matriz extracelular resultando em uma maior propagação viral. Da mesma forma, a indução da morte das células cancerosas com um agente indutor de apoptose antes da injeção com vírus oncolítico também resulta em maior propagação viral. O aumento da pressão hidrostática intersticial resultante de fibrose diminui a eficácia da entrada do vírus assim como eles podem escapar pelo local da injeção ou serem drenados pela circulação diminuindo a sua eficácia e aumentando os riscos sistêmicos de toxicidade. Outra característica de tumores é hipóxia, que reduz a replicação dos vírus oncolíticos assim como altera a expressão dos receptores de superfície. Desta maneira, é importante para o desenvolvimento de vírus oncolíticos, saber se o mecanismo de multiplicação viral não é atenuado pela hipóxia destes tecidos, assim como acontece com os *vaccinia virus* e o HSV (WONG, 2010). Como mostra a figura 2, após a administração sistêmica, a maioria do inóculo inicial poderá ser absorvida pelo fígado, os vírus que caírem na circulação podem ser rapidamente neutralizados pelas células sanguíneas, através do sistema do complemento ou por anticorpos neutralizantes. Para o vírus ter acesso ao tumor, ele deverá deixar a circulação e atravessar o endotélio vascular contra o gradiente de pressão do fluido intersticial. Além disso, poderá existir infiltrados de linfócitos que limitarão a propagação viral através de liberação de mediadores inflamatórios e citocinas (Parato, et al, 2005).

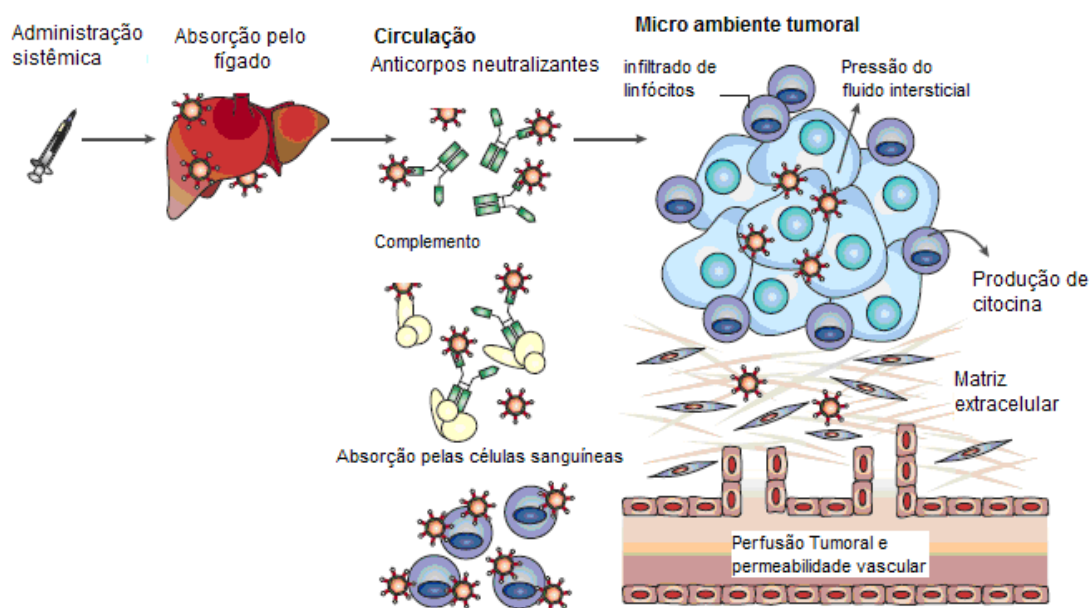


Figura 2: Barreiras dos vírus oncolíticos ao tumor. Administração sistêmica do inóculo, pode ser absorvida pelo fígado, células sanguíneas, através do sistema complemento ou anticorpos neutralizantes. Para atingir o tumor, o vírus deverá atravessar o endotélio vascular e passar pelos linfócitos que limitarão a propagação viral através de liberação de mediadores inflamatórios e citocinas (adaptado de PARATO, et al, 2005).

Um dos maiores obstáculos a longo prazo na viroterapia é a interação do sistema imune inato com o vírus. Desta forma, a utilização de agentes imunomoduladores combinados com os vírus oncolíticos, tais como a ciclofosfamida (sabidamente inibidora do sistema imune inato) tem demonstrado aumentar significativamente a propagação viral, sendo capaz de inibir a indução de anticorpos neutralizantes, macrófagos, indução de células T regulatórias e produção de interferon (LIU, KIRN, 2008).

Ao invés de injetar vírus puro, células estão sendo utilizadas como veículos para transportar e esconder o antígeno viral dos anticorpos e do sistema complemento. Esta estratégia envolve a infecção *in vitro* de células e sua administração sistêmica, que carreará o vírus oncolítico para o tumor. As células que estão sendo testada são: células mesenquiais, monócitos, células endoteliais, células tumorais, células T e células dendríticas. Uma gama de genes imunostimulatórios estão sendo inseridos no genoma de vírus

oncolíticos com o objetivo de estimular eficientemente a resposta imune anti-tumoral. Alguns exemplos são quimiocinas, proteínas do choque térmico, fator estimulador de colônia de macrófago e algumas interleucinas (IL-18 e IL-24). O vírus vaccínia, normalmente, expressa proteínas inibidoras de interferon do tipo 1 para neutralizar a resposta anti-viral através de interferons. Como as células cancerosas freqüentemente inativam a via do interferon, o *Vaccinia virus* do qual tiver sido retirado o gene anti-interferon poderá replicar seletivamente nessas células tumorais (WONG, 2010).

A descoberta da base genética da nocividade do câncer promoveu, em parte, o desenvolvimento da terapia gênica contra o câncer, a qual envolve a introdução de ácidos nucléicos exógenos que podem restaurar, expressar ou inibir um gene particular de interesse, sendo os vírus o mais eficiente sistema de transporte destes genes. Os vírus oncolíticos podem ter genes anti-câncer que incluem genes supressores de tumor, pro-apoptóticos, anti-angiogênicos, suicidas ou genes imunomodulatórios que normalmente não estão presentes nas células cancerosas (WONG, 2010).

A multiplicação seletiva intratumoral destes vírus pode levar a uma melhora eficaz no tratamento do câncer em relação aos agentes não replicantes, devido à própria natureza viral de multiplicação, lise, infecção e propagação em células adjacentes. Uma grande limitação desta técnica é que a retirada de genes que conferem a especificidade tumoral frequentemente resulta em diminuição da propriedade oncolítica (WONG, 2010).

A figura 3 demonstra como ocorre a infecção pelos vírus oncolíticos e a morte das células tumorais. Em (a) podemos observar a interação dos vírus com os receptores de superfície das células tumorais, que estão mais expressadas nas células tumorais do que nas células normais, seguindo a ligação e a internalização por endocitose ou fusão de membrana do genoma viral. A replicação do DNA e a expressão dos genes virais serão totalmente dependente da maquinaria celular e poderá ocorrer no citoplasma (como os *Vaccinia virus* e *Vesicular stomatitis virus* ou no núcleo (como os *adenovirus*). A presença viral leva a ativação das defesas celulares, tal como apoptose ou lise das células infectas mediada por células T CD8, que reconhece o peptídeo viral

apresentado pelo complexo de histocompatibilidade. Alternativamente, as células podem lise devido ao grande número de virions formados ou pela ativação da apoptose durante o ciclo de multiplicação e expressão viral (Parato, et al, 2005).

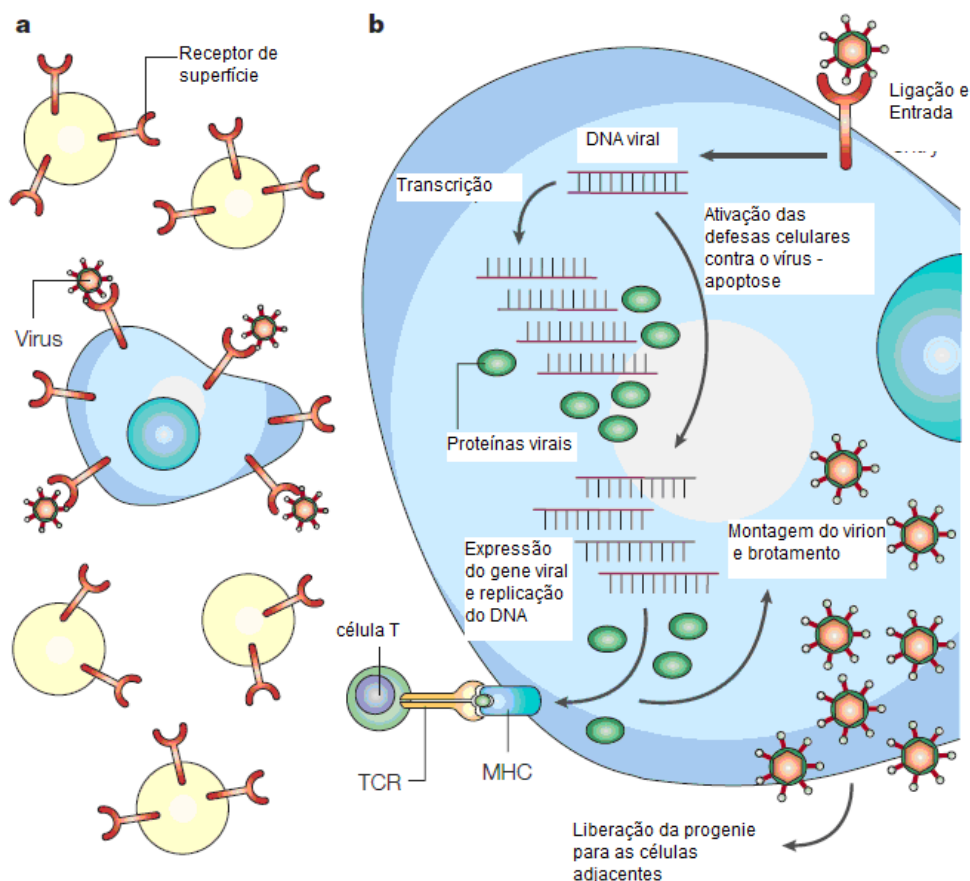


Figura 3: Interação e morte da célula tumoral pelos vírus oncolíticos. Em (a) Interação dos vírus com os receptores de superfície das células tumorais, seguindo a ligação e a internalização por endocitose ou fusão de membrana do genoma viral. A replicação do DNA e a expressão dos genes virais leva a ativação das defesas celulares, tal como apoptose ou lise das células infectadas mediada por células T CD8, que reconhece o peptídeo viral apresentado pelo complexo de histocompatibilidade. As células podem liberar os virions formados lisando-a ou por apoptose durante o ciclo de replicação e expressão viral (adaptado de PARATO, et al, 2005)

Pesquisas futuras envolvendo poxvírus oncolíticos deverão explorar a sinalização entre uma célula normal e uma célula transformada, e desta forma os vírus oncolíticos poderão ser utilizados para transportar transgenes que auxiliarão na eliminação do tumor e na imunoterapia (MEYER, 2008).

2.3 VACCINIA VIRUS ONCOLÍTICO

Muitos grupos de pesquisas vêm investigando várias estratégias imunoterapêuticas para aumentar a resposta imune contra antígenos associados a tumor. Vírus recombinantes vêm sendo estudados para serem utilizados como veículos de transportes de genes de interesse para as células cancerosas devido à alta eficiência de transdução e propriedades oncolíticas (CHUANG, 2009).

Entretanto, o *Vaccinia virus* tem demonstrado preferência em infectar células tumorais a infectar tecidos normais em vários experimentos (CHUANG, 2009). Estudos recentes mostraram que o *Vaccinia virus* aplicado em camundongos infectou, preferencialmente, células tumorais ovarianas e não tecidos saudáveis, gerando respostas antitumorais significantes visualizadas através de um sistema de luminescência o qual facilitou a monitoração do crescimento e proliferação das células cancerosas (HUNG, et al., 2007).

Injeções intratumorais do *Vaccinia virus* são potencialmente promissoras na geração de imunidade tumoral específica, pois o vírus causa diretamente a lise da célula tumoral, a qual liberará os antígenos tumorais naquele microambiente. Isto resultará na propagação de epitópos de antígenos tumorais induzindo uma imunidade específica (CHUANG, 2009). Além disso, o *Vaccinia virus* pode transportar genes que facilitarão na indução desta imunidade, isto vem sendo alcançado através da expressão de genes imunomodulatórios, genes marcadores, proteínas terapêuticas ou através de enzimas conversoras de drogas (WORSCHKECH et al., 2009).

Outras vantagens da utilização do *Vaccinia virus* são: a susceptibilidade de infecção na maioria das células tumorais, lise das células infectadas, indução e ativação das respostas de células T citotóxicas locais e células Natural Killers, além de não causar patologias sérias em humanos (WORSCHKECH et al., 2009).

3 JUSTIFICATIVA

Este estudo se reveste de importância, na medida em que o câncer tem se tornado atualmente a doença com maior índice de mortalidade no mundo, a qual possui tratamentos invasivos, dolorosos ao paciente e muitas vezes não aumentam a sobrevida global de pacientes com a doença local ou metastática. Tentativas para melhorar a detecção precoce e o tratamento de câncer em estágios avançados não têm sido bem sucedidas, desta forma, o desenvolvimento de terapias inovadoras para o controle desta doença vem sendo objetivado. A utilização de poxvírus oncolíticos é uma ferramenta promissora no tratamento para o combate do câncer.

A viroterapia utilizando vírus oncolíticos mostra vantagens em comparação com as vacinas convencionais, tais como liberação de antígenos associados ao tumor específicos; inflamação local, aumentando as respostas imune locais, além de genes que aumentam a imunidade poderem ser inseridos facilmente através de vetores virais; diferentemente da quimioterapia e radioterapia, a citorredução através dos vírus oncolíticos não prejudica o sistema imunológico normal, sendo isto fundamental para a imunidade anti-tumoral (LI, *et. al*, 2008).

4 OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo descrever a utilização de poxvírus oncolíticos e suas vantagens no tratamento de câncer.

5 METODOLOGIA

Com o intuito de alcançar o objetivo proposto de descrever a utilização dos poxvírus oncolíticos no tratamento contra o câncer, foi realizada uma pesquisa bibliográfica, que segundo Macedo (1996) é a busca de informações bibliográficas e seleção de documentos que se relacionam com o problema da pesquisa. O levantamento de artigos foi realizado na base de dados Pubmed, utilizando os descritores: *poxvirus*, *oncolytic* e *cancer*, sendo critério de inclusão artigos publicados posteriormente ao ano de 2000.

6 RESULTADO E DISCUSSÃO

Após o levantamento e leitura dos artigos na base de dados destaco algumas considerações a respeito da utilização do Poxvírus como ferramenta terapêutica no tratamento contra o câncer.

Uma das principais dificuldades para a propagação dos vírus em tumores é a barreira física no microambiente do tumor, incluindo-se a matriz extracelular e anticorpos neutralizantes. Utilizando uma das formas infectivas dos poxvírus, conhecida como vírus envelopado extracelular (EEV), a qual é uma forma viral protegida por uma bicamadada lipídica derivada da célula hospedeira, KIRN et al.(2008) puderam comparar o potencial oncolítico de amostras produtoras de EEV.

Amostras altamente produtoras de EEV mostraram se multiplicariam melhor nos tumores após a sua chegada aos tecidos, resultando em efeitos antitumorais significativamente melhores. Estas amostras possuem uma grande habilidade de propagação no sangue mesmo em injeções distantes do tumor, sendo neutralizadas por anticorpos com menos intensidade que outras formas infecciosas (KIRN *et al.*, 2008).

YU *et al.* (2009) estudaram os efeitos terapêuticos do *Vaccinia virus* atenuado (GLV-lh68), como um agente oncolítico contra seis linhagens de carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço. Esta amostra do *vaccinia virus* possui uma mutação no gene codificador da timidina quinase, que aumentou a seletividade para tumores e diminui a multiplicação em tecidos normais. GLV-lh68 também possui uma mutação no gene da hemaglutinina, e inserção dos cassetes gênicos da beta-galactosidase e beta-glucuronidase, resultando em redução de sua virulência. Neste estudo foi observada uma alta e eficiente expressão emultiplicação viral em quatro das seis linhagens, sugerindo que existem fatores nas células cancerosas que determinam a permissividade ao vírus.

Em outro estudo, utilizando a mesma amostra do *Vaccinia virus*, GLV-lh68, que também possui o gene codificador da proteína verde fluorescente da alga *Aequorea* inserido em seu genoma, Zhang, et al. (2007) injetaram o vírus

em um camundongo com tumor de mama humano. Foi demonstrada uma preferência do vírus para a colonização do tumor em detrimento dos outros órgãos, resultando em menor toxicidade e permitindo uma sobrevivência maior dos camundongos portadores do câncer. Esta amostra, GLV-Ih68, causou regressão e completa eliminação do tumor de mama no animal. Esta regressão ocorreu em três fases: na primeira, foi observado um ligeiro aumento do tumor dos camundongos infectados em comparação com o grupo controle. Isto se deve a resposta inflamatória e a expressão do fator de crescimento após a infecção viral. Esse aumento de volume do tumor sugere que a colonização viral inicial não é suficiente para interferir no crescimento do tumor. Na segunda fase, através da emissão de luz pode se acompanhar a colonização e multiplicação viral no tumor, e aproximadamente 14 dias após a injeção o crescimento do tumor foi reduzido, indicando que o *Vaccinia virus* oncolítico começou a interferir no crescimento tumoral, provavelmente através da lise das células tumorais. Nesta fase de inibição, o número de células lisadas corresponderiam ao mesmo número de células em divisão, isto foi demonstrado pelo nível constante de luz fluorescente emitida. Na última fase, ocorreu uma rápida regressão tumoral e, conseqüentemente, uma redução da emissão de luz.

O sucesso da regressão do tumor de mama humano pela infecção do GLV-Ih68 sugere que a atenuação do vírus pela tripla mutação gênica permite que o vírus tenha tempo para a replicação e oncólise do tumor até a sua total eliminação (Zhang, et al. 2007).

A atividade oncolítica do *Vaccinia virus* já foi demonstrada em tratamentos para câncer de tireóide, mama, pulmão e pancreático. Esta preferência, pode ser pela infecção do *Vaccinia virus* produzir uma alta resposta imunogênica, com altas quantidades de linfócitos T citotóxicos e elevados títulos de anticorpos que poderiam ser detectados décadas após a infecção (KIRN, THORNE, 2009). Estas características e outras propriedades, tais como rápido e eficiente ciclo multiplicativo; ótima propagação nas células; genoma grande, o qual aceita a incorporação de múltiplos genes heterólogos, além de possuir promotores fortes capazes de promover a expressão dos

trasgenes na célula do hospedeiro, segurança; e poucos efeitos adversos permitiriam seu uso na imunoterapia contra o câncer (ZEH, BARTLETT, 2002).

Outro membro da família poxvirus, o *Myxoma vírus*, pode ser um possível candidato no tratamento de câncer com vírus oncolíticos. Seu genoma foi seqüenciado e muitas proteínas imunomoduladoras por ele codificadas estão sendo caracterizadas. A infecção por *Myxoma vírus* é permissiva em uma grande variedade de células cancerígenas e pesquisas in vitro demonstraram que podem se multiplicar e matar na maioria das linhagens listadas no Instituto Nacional do câncer (NCI) (RAHMAN et al.,2010).

LUN et al. (2005), propuseram um estudo para verificar a eficácia e segurança deste vírus oncolítico em modelos experimentais contra linhagens de gliomas humanos in vivo e in vitro. In vitro, a maioria das linhagens testadas mostrou ser permissiva para a replicação do *Myxoma virus* e foram mortas pela infecção. A inoculação intracerebral deste vírus foi bem tolerada, produzindo uma pequena inflamação local no sítio de inoculação.

A natureza não patogênica destes vírus em células humanas, a possibilidade de modificação genética, a habilidade de produzir uma infecção viral longa em células tumorais e a ausência de anticorpos pré-existentes na população humana sugerem que o *Myxoma virus* pode ser um atraente agente oncolítico para ser usado contra gliomas humanos (LUN et al., 2005)

Este vírus desenvolveu uma gama de estratégias de evasão para sobreviver “in vivo”, deste modo o estudo e manipulação desses fatores poderiam ser utilizados no aprimoramento desse vetor. Um estudo profundo das proteínas codificadas pelo vírus demonstra que muitas delas são capazes de suprimir o sistema imune inato e as células T auxiliares do tipo 1 (ZEH, BARTLETT, 2002).

7 CONCLUSÃO

Terapias anti-tumorais que utilizam-se de mecanismos inovadores são de grande utilidade para tratamento de cânceres recorrentes e resistentes as usuais radio e quimioterapia. A introdução dos vírus oncolíticos pode ser o grande avanço na cura e prevenção para o câncer. Para um vírus oncolítico ser considerado viável para oncoterapia em humanos, deve ter estrito tropismo para as células cancerígenas, segurança no tratamento e nos efeitos colaterais e grande potencial na resposta imunogênica (STANFORD et al.,2008).

Os poxvírus possuem essas características, tendo o *Vaccinia virus* como pioneiro, devido à sua utilização na ampla imunização contra a varíola e além de estar sendo estudado exaustivamente em laboratórios. Assim há um extenso conhecimento das propriedades biológicas, multiplicativas e imunogênicas, o que demonstra sua segurança e efetividade, possibilitando o desenvolvimento de uma terapia viral oncolítica para o câncer (STEELE, 2000).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CONDIT et al. In A Nutshell: Structure And Assembly Of The Vaccinia Virion, **Advances In Virus Research**, v. 66, p.31-124, 2006.

GANESH, S., et al. Intratumoral coadministration of hyaluronidase enzyme and oncolytic adenoviruses enhances virus potency in metastatic tumor models. **Cancer Research**, v.14, p. 3933–3941, 2008.

GURLEVIK E, et al. p53-dependent antiviral RNA-interference facilitates tumor-selective viral replication. **Nucleic Acids Research** v. 37, n. 12, e84, 2009.

HUNG, C.F. et al. Vaccinia virus preferentially infects and controls human and murine ovarian tumors in mice. *Gene Therapy*, v.14, p. 20-29, 2007.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Disponível em:

<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=2> Acessado em 12 de fevereiro de 2011.

KIRN, D. H. *et al.* Targeting of interferon-beta to produce a specific, multi-mechanistic oncolytic vaccinia vírus. **PLoS Medicine**. V. 4, p. 2001- 2012, 2007.

KIRN, D. H. *et al.* Enhancing Poxvirus Oncolytic Effects through Increased Spread and Immune Evasion, **Cancer Research** v. 7, p. 2071 - 2075, 2008.

KIRN, D.; THORNE, S. Targeted and armed oncolytic poxviruses: a novel multi-mechanistic therapeutic class for cancer. **Nature Reviews**, v. 9, p. 64 - 71, 2009.

KOLODKIN-Gal D, et al. A. Herpes simplex virus type 1 preferentially targets human colon carcinoma: role of extracellular matrix. **Journal of Virology**, v. 82, p.999–1010, 2008.

KOSKELA M.J.V. Va"ha" *et al.* Oncolytic viruses in cancer therapy. **Cancer Letters**, v. 254, p. 178–216, 2007.

OLD, L.J. Immunotherapy for cancer. **Scientific American**, v. 275, p. 136-143, 1996.

LEE J. H. *et al* Oncolytic and immunostimulatory efficacy of a targeted oncolytic poxvirus expressing human GM-CSF following intravenous administration in a rabbit tumor model **Cancer Gene Therapy** , v. 17, p. 73 - 79, 2010.

LI, Q., LIU, G., WONG-STAAAL, F. Oncolytic virotherapy as a personalized cancer vaccine. **International Journal of Cancer**, v.123, p.493-499, 2008.

LIU, T.C., KIRN, D. Gene therapy progress and prospects cancer: oncolytic viruses. **Nature**, v.15, p.877-884, 2008

LUN, X., et al. Myxoma virus is a novel oncolytic virus with significant antitumor activity against experimental human gliomas **Cancer Research**, v. 65, p. 9982-9990, 2005.

MACEDO, N. D. **Iniciação à pesquisa bibliográfica**. 2 edição, São Paulo, p 13, 1996.

McCart J.A., et al. Systemic cancer therapy with a tumor selective Vaccinia virus mutant lacking thymidine kinase and vaccinia growth factor genes. **Cancer Research**, v. 61, p. 8751–8757, 2001.

MEYER, V.S. Selective analysis of specific HLA ligand repertoires: poxviral CD8+ T cell epitopes and phosphorylated HLA ligands of tumor cells. Dissertação, 2008

MOSS, B. Genetically, engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination and safety. **National Academy of Sciences**, v93, p.11341-11348, 1996.

PARATO, K.A., et al. Recent Progress In The Battle Between Oncolytic Viruses And Tumours, **Nature**, v.5, p. 965-976, 2005.

RAHMAN, M. M. *et al.* Oncolytic viral purging of leukemic hematopoietic stem and progenitor cells with Myxoma virus **Cytokine & Growth Factor Reviews** v. 21, p. 169–175, 2010.

ROBERT, K.L., SMITH, G. Vaccinia virus Morphogenesis And Dissemination, **Trends in Microbiology**, v.16 n.10, p. 472- 479, 2008.

SHEN, Y.; NEMUNAITIS, J. Fighting Cancer with Vaccinia virus: Teaching New Tricks to an Old Dog. **Molecular Therapy** v. 11, n. 2, p. 180 -195, 2005.

STANFORD, M. M. *et al* Myxoma Virus Oncolysis of Primary and Metastatic B16F10 Mouse Tumors *In Vivo* **The American Society of Gene Therapy** v. 16 n. 1, p. 52 - 59, 2008.

STEELE, T.A. Recent Developments in the virus therapy of cancer. **Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine**. v. 223, p. 118 -127, 2000.

WONG, H.H., LEMOINE, L.R., WANG, Y., Oncolytic Viruses for Cancer Therapy: Overcoming the obstacles, **Viruses**, v.2, p. 78-106, 2010

WORSCHKECH, A. *et al.* The immunologic aspects of poxvirus oncolytic therapy. **Cancer Immunol Immunother**, v.58, p. 1355–1362, 2009.

Yu, Z. *et al.* Oncolytic vaccinia therapy of squamous cell carcinoma. **Molecular Cancer**, v. 8, p. 45 - 54, 2009.

ZEH, H.; BARTLETT, D. Development of a replication-selective, oncolytic poxvirus for the treatment of human cancers. **Cancer Gene Therapy**, v. 9, p. 1001 - 1012, 2002.

ZHANG Q. et al. Eradication of Solid Human Breast Tumors in Nude Mice with an Intravenously Injected Light-Emitting Oncolytic Vaccinia virus **Cancer Research**, v. 67, p.10038-10046, 2007.