

**Universidade Federal de Minas Gerais**

**Curso de Especialização em Diagnóstico e Controle Microbiológico**

**Jéssica Pauline Coelho Souza**

**O uso do alphaherpesvírus humano 1 oncolítico como estratégia terapêutica  
no controle de células metastáticas do câncer de mama**

**Belo Horizonte**

**2019**

**Jéssica Pauline Coelho Souza**

**O uso do alphaherpesvírus humano 1 oncolítico como estratégia terapêutica  
no controle de células metastáticas do câncer de mama**

Monografia apresentada ao Curso de Especialização em Microbiologia a Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, como requisito para a obtenção do título de Especialista em Microbiologia.

**Orientador: Prof<sup>a</sup> Dra. Giliane de Souza Trindade**

**Co-orientadora: Mestre Jaqueline Silva de Oliveira**

**Belo Horizonte**

**2019**

043

Souza, Jéssica Pauline Coelho.

O uso do alphaherpesvírus humano 1 oncolítico como estratégia terapêutica no controle de células metastáticas do câncer de mama [manuscrito] / Jéssica Pauline Coelho Souza. – 2019.

132 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dra. Giliane de Souza Trindade. Co-orientadora: Jaqueline Silva de Oliveira.

Monografia apresentada ao Curso de Especialização em Microbiologia a Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, como requisito para a obtenção do título de Especialista em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Neoplasias da Mama. 3. Vírus Oncolíticos. 4. Terapia Viral Oncolítica. 5. Alphaherpesvirinae. I. Trindade, Giliane de Souza. II. Oliveira, Jaqueline Silva de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579

Ficha Catalográfica elaborada por Fabiane C. M. Reis – CRB: 6 /2680

Fonte: Souza (2019).



**Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia**

Às 10:00 horas do dia 20 de dezembro de 2019 reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG a Banca Debatedora constituída pela Dra. Lorena Christine Ferreira da Silva (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG) e a Profa. Giliane de Souza Trindade - Orientadora, para avaliar a Monografia intitulada "O uso dos alphaherpesvirus humano 1 oncolíticos como estratégia terapêutica no controle de células metastáticas do câncer de mama", da aluna **Jéssica Pauline Coelho Souza**. Após a apresentação oral pública seguida de uma arguição, a aluna foi APROVADA, considerando as sugestões feitas pela Banca Debatedora. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que será assinada pelos membros da Banca. Belo Horizonte, 20 de dezembro de 2019.

Dra. Lorena Christine Ferreira da Silva

Profa. Giliane de Souza Trindade - Orientadora

Prof. Flaviano dos Santos Martins

Subcoordenador do Curso de Especialização em Microbiologia

ICB/UFMG

Prof. Flaviano S. Martins  
Dep. Microbiologia  
ICB/UFMG

Dedico este trabalho a Deus e à minha família.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar e sempre, agradeço a Deus por todas as bênçãos e dádivas concedidas e por tornar os meus sonhos possíveis. Agradeço por me revestir de fé, força e resignação nos momentos difíceis, e sabedoria nos momentos de alegria. Agradeço ainda, por ter me agraciado com uma família tão abençoada, unida e amorosa.

Aos meus pais, Ednilson e Zoraide, muito obrigada por todo o apoio, paciência, incentivo, participação, generosidade e lições, que culminaram na formação do meu caráter e em todas as conquistas alcançadas até aqui. Vocês são pais verdadeiramente iluminados!

A minha irmã, amiga, confidente e companheira, Kênia, agradeço por sua inseparável e inigualável amizade e companheirismo. Obrigada pelas sábias palavras de conforto e apoio nas horas de luta, e por dividir comigo todos os momentos felizes de nossas vidas!

Aos demais familiares obrigada pelo apoio e torcida de sempre.

A minha querida orientadora, professora Dra. Giliane, por realizar a minha orientação de maneira tão compreensiva, dedicada e paciente. Obrigada por participar e contribuir para mais uma realização em minha vida!

À querida co-orientadora, mestre Jaqueline, muitíssimo obrigada pela incomparável contribuição e carinho. Sou imensamente grata por sua especial dedicação, paciência, generosidade e incentivo.

Aos professores do curso de Especialização, sou grata pelo conhecimento adquirido através das aulas e experiências passadas durante o curso. Obrigada também pelo o incentivo e apoio para com todos os alunos do curso.

À UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais – pela qualidade de ensino, projetos de pesquisa e todas as oportunidades oferecidas aos seus alunos.

Grata por todos aqueles que incentivam e torcem pelo meu sucesso.

“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo propósito debaixo do céu.”

**- Eclesiastes 3-1**

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Tipos de crescimento celular.....	24
Figura 2. Diferenças entre tipos de tumores .....	25
Figura 3. Processo de Metástase.....	26
Figura 4. TNM - Classificação Clínica de Tumores Malignos da Mama (T – Tumor Primário)). .....	29
Figura 5. TNM - Classificação Clínica de Tumores Malignos da Mama (N – Linfonodos Regionais*). .....	30
Figura 6. TNM - Classificação Clínica de Tumores Malignos da Mama (M – Metástases a Distância).....	31
Figura 7. Dados mundiais referentes ao número de novos casos de cânceres mais frequentes em mulheres no ano de 2018 .....	34
Figura 8. Taxas de incidência do câncer de mama no mundo por idade padronizada, todas as idades .....	35
Figura 9. Incidência e mortalidade mundial do câncer de mama, por idade padronizada.....	37
Figura 10. Taxas de mortalidade mundiais do câncer de mama padronizadas por idades, para todas as idades .....	37
Figura 11: Número de novos casos de cânceres em mulheres brasileiras para o ano de 2018.	38
Figura 12: Taxas de mortalidade por câncer de mama no Brasil no período de 1992 a 2012..	39
Figura 13. Indução de imunidade antitumoral local e sistêmica por vírus oncolíticos .....	50
Figura 14: Barreiras dos vírus oncolíticos ao tumor.....	56
Figura 15. Representação esquemática dos mecanismos antitumorais de vírus oncolíticos no câncer de mama .....	68
Figura 16. Relação filogenética entre os herpesvírus humanos.....	70
Figura 17. Estrutura do alphaherpesvírus humano 1 .....	72
Figura 18. Microscopia eletrônica e microscopia crio-eletrônica do alphaherpesvírus humano 1.....	73
Figura 19. Mecanismo de penetração do alphaherpesvírus humano 1 na célula hospedeira ...	75
Figura 20. O ciclo de multiplicação do alphaherpesvírus humano 1.....	77
Figura 21. Mapa do genoma do alphaherpesvírus humano 1 e representação esquemática de vetores competentes e defeituosos para multiplicação .....	80
Figura 22. Estruturas do G207.....	82



Figura 23. Estratégia de terapia oncolítica usando o alphaherpesvírus humano 1 associado a um gene imunoestimulador. .... 85

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos por estádios de câncer de mama.....	32
Tabela 2. Número de mortes associadas ao câncer de mama e grupos etários específicos no período de 1992 a 2012. ....	40
Tabela 3. Vetores oncolíticos de alphaherpesvírus humano 1 e ensaios clínicos.....	87

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ado - Adenovírus oncolíticos

ADP - Proteína de morte por adenovírus

ALDN - Dissecção dos Linfonodos Axilares

APCs - Células Apresentadoras de Antígenos

ASMR - Taxa de Mortalidade Padronizada Por Idade

CD - Citosina desaminase

CD40L – Ligante de CD40

CDI – Carcinoma Ductal Invasivo

CDIS – Carcinoma Ductal *In Situ*

CEA – Antígeno Carcinoembrionário

CMV - citomegalovírus

CSCs - Células-tronco de câncer

DAF – Fator de Aceleração de Decaimento

DAMPs - Padrões Moleculares Associados ao Perigo

EBV - vírus Epstein-Barr

ECM - Matriz Extracelular

EGFR - Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico

ER - Receptor de Estrogênio

ERBB2 – Fator de Crescimento Epidérmico 2

ER- $\alpha$  – Receptor de Estrogênio Alfa

FDA - Food and Drug Administration

FMGs - Glicoproteínas de Membrana Fusogênica

GBECAM - Grupo de Estudos do Câncer de Mama

GBM - Glioblastoma Multiforme

GM-CSF - Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos-Macrófagos

GPs – Glicoproteínas

HBOC – Câncer de Mama e Ovário Hereditário

HMGB1 - Grupo de Alta Mobilidade Caixa 1

HSP - Proteína de Choque Térmico

ICAM-1 - Molécula de Adesão Intercelular 1

ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses

IFN – Interferon

IFN-I – Interferon do tipo 1

IFN- $\gamma$  – Interferon Gama

IL-12 – Interleucina 12

IL-2 - Interleucina-2

IL-2R - Receptor de IL-2

INCA – Instituto Nacional do Câncer

KB – Kilobase

LATs - Transcritos associados à latência

MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade

miRNAs - microRNAs

miRTS - miRNA Sintéticos

MMP - Metaloproteinases de Matriz

MPS - Sistema Fagocitário Mononuclear

MSCs - Células-tronco mesenquimais

NCBI – National Center for Biotechnology Information

NCCN - National Comprehensive Cancer Network

NDV - vírus da doença de Newcastle

NK – Natural Killer

PAMPs - Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PEG – Polietilenoglicol

PR – Receptor de Progesterona

PSA - Antígeno Prostático Específico

PTX – Paclitaxel

RE – Retículo Endoplasmático

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio

RR – Ribonucleotídeo redutase

SCIELO – Scientific Eletronic Library Online

TAAAs – Antígenos Associados a Tumores

TCR - Receptor de Células T

TGF – Fator de Crescimento Transformador

TK – Timidina Kinase

TLR – Toll-like

TNBC – Triplo Negativo de Câncer de Mama

TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$

TNM – Sistema de Classificação de Tumores Malignos (Tumor, Nódulo, Metástase)

TRAIL - Ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral

T-VEC - Talimogene Laherparepvec

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UICC – União Internacional Contra o Câncer

UL – Único Longo

US – Único Curto

VACV – vaccínia vírus

VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

VSV – vírus da estomatite vesicular

VZV – vírus varicela zoster

WHO – World Health Organization

## **RESUMO**

O câncer de mama representa um importante problema de saúde pública, sendo a neoplasia de maior prevalência entre as mulheres, no Brasil e no mundo. Com uma incidência relevante, o tumor de mama tem se tornado mais frequente nos últimos anos, sobretudo, nos países de baixa e média renda, como o Brasil; resultado de fatores como a melhora da expectativa de vida, urbanização e adoção de estilos de vida ocidentais têm contribuído para esse desfecho. Globalmente, cerca de 1,38 milhões de mulheres são diagnosticadas com câncer de mama e, aproximadamente 458 mil morrem por esse tipo de tumor todos os anos. A principal terapêutica para o câncer de mama é a mastectomia ou amputação da mama, o que remete à mutilação do corpo feminino, visto que a mama representa feminilidade, sexualidade e maternidade. Esse tratamento, invasivo e agressivo, ainda é complementado com outras terapêuticas, a radioterapia e a quimioterapia, que também provocam distúrbios na identidade feminina e danos ao organismo como um todo. Contudo, nenhum dos tratamentos mencionados é eficaz contra as metástases mamárias e, portanto não garante a cura da doença, sendo possível a reincidência da doença a partir das células metastáticas. Logo, o atual cenário composto pelas terapêuticas tradicionais para o controle do câncer de mama demonstra a necessidade de aprimoramento ou inserção de novas metodologias, que controlem efetivamente as metástases mamárias, bem como amenizem e/ou contornem a invasão e agressividade dos tratamentos tradicionais. Nesse contexto, diversos vírus têm se mostrado promissores como terapia para o câncer, dentre eles o alphaherpesvírus humano 1 oncolítico. A viroterapia oncolítica é baseada na estimulação do sistema imunológico e eliminação das células tumorais, através da infecção seletiva das células cancerígenas por determinados vírus, além de induzir uma resposta de memória antitumoral. Portanto, esse trabalho consistiu em uma compilação bibliográfica sobre o potencial oncolítico do alphaherpesvírus humano 1 aplicado às células metastáticas do câncer de mama. Desse modo, utilizando as palavras, vírus oncolíticos, câncer de mama, viroterapia oncolítica, alphaherpesvírus humano 1 e alphaherpesvírus humano 1 oncolíticos, foi realizado um levantamento de aproximadamente 340 artigos sobre o potencial oncolítico do alphaherpesvírus humano 1.

**PALAVRAS-CHAVE:** *vírus oncolíticos, câncer de mama, viroterapia oncolítica, alphaherpesvírus humano 1, alphaherpesvírus humano 1 oncolíticos.*

## **ABSTRACT**

Breast cancer represents an important public health problem, being the most prevalent cancer among women, in Brazil and worldwide. With a relevant incidence, breast cancer has become more frequent in recent years, especially in low and middle income countries, such as Brazil; Factors such as improved life expectancy, urbanization, and the adoption of Western lifestyles have all contributed to this outcome. Globally, about 1.38 million women are diagnosed with breast cancer, and approximately 458,000 die from breast cancer each year. The main therapy for breast cancer is mastectomy or amputation of the breast, which refers to female body mutilation, since the breast represents femininity, sexuality and motherhood. This invasive and aggressive treatment is complemented by other therapies, radiotherapy and chemotherapy, which also cause disturbances in female identity and damage to the body as a whole. However, none of the mentioned treatments is effective against breast metastases and, therefore, does not guarantee the cure of the disease, being possible the recurrence of the disease from the metastatic cells. Thus, the current scenario of traditional breast cancer control therapies demonstrates the need for improvement or insertion of new methodologies that effectively control breast metastases, as well as mitigate and / or circumvent the invasion and aggressiveness of traditional treatments. In this context, several viruses have been promising as cancer therapy, including oncolytic human alphaherpesvirus 1. Oncolytic virotherapy is based on stimulation of the immune system and elimination of tumor cells through selective infection of cancer cells by certain viruses, and induces an antitumor memory response. Therefore, this work consisted of a bibliographic compilation of the oncolytic potential of human alphaherpesvirus 1 applied to metastatic breast cancer cells. Thus, using the words, oncolytic virus, breast cancer, oncolytic virotherapy, human alphaherpesvirus 1 and oncolytic human alphaherpesvirus 1, a survey of approximately 340 articles was conducted on the oncolytic potential of human alphaherpesvirus 1.

**PALAVRAS-CHAVE:** *oncolytic viruses, breast cancer, virotherapy oncolytic, human alphaherpesvirus 1, human alphaherpesvirus 1 oncolytics.*

## SUMÁRIO

- LISTA DE FIGURAS	
- LISTA DE TABELAS	
- LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
- RESUMO	
-ABSTRACT	
1.0 INTRODUÇÃO.....	18
2.0 OBJETIVOS.....	21
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
3.0 METODOLOGIA.....	22
4.0 REVISÃO DE LITERATURA .....	23
4.1 CÂNCER DE MAMA.....	23
4.1.1 PATOGÊNESE DO CÂNCER .....	23
4.1.2 ASPECTOS BIOLÓGICOS DO CÂNCER DE MAMA.....	26
4.1.3 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA NO MUNDO .....	33
4.1.4 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA NO BRASIL .....	38
4.1.5 TRATAMENTOS DISPONÍVEIS PARA O CÂNCER DE MAMA.....	41
4.2 VIROTERAPIA ONCOLÍTICA .....	45
4.2.1 BREVE HISTÓRIA DOS VÍRUS ONCOLÍTICOS.....	45
4.2.2 VÍRUS ONCOLÍTICOS .....	47
4.2.2.1 MECANISMO DE AÇÃO DOS VÍRUS ONCOLÍTICOS .....	48
4.2.2.2 TROPISMO NATURAL DOS VÍRUS ONCOLÍTICOS .....	51
4.2.2.3 ENGENHARIA GENÉTICA E VIROTERAPIA ONCOLÍTICA .....	52
4.2.2.4 BIODISTRIBUIÇÃO DOS VÍRUS ONCOLÍTICOS .....	55
4.2.2.5 LIMITAÇÃO DAS RESPOSTAS IMUNES ANTIVIRAIS .....	58
4.2.2.6 VIROTERAPIA COMBINADA.....	59
4.3 OS VÍRUS ONCOLÍTICOS COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA NO CÂNCER DE MAMA .....	61
4.3.1 ESPÉCIES DE VÍRUS ONCOLÍTICOS PARA O CÂNCER DE MAMA .....	61
4.3.2 MECANISMOS DE AÇÃO.....	62
4.4 HERPESVIRUS .....	69
4.4.1 ASPECTOS TAXONÔMICOS.....	69
4.4.2 BIOLOGIA VIRAL.....	71



4.4.3 MULTIPLICAÇÃO VIRAL .....	74
4.5 ALPHAHERPESVÍRUS HUMANO 1 APLICADO A VIROTERAPIA ONCOLÍTICA	78
4.6 ALPHAHERPESVÍRUS HUMANO 1 APLICADO À VIROTERAPIA ONCOLÍTICA EM METÁSTASES DE CÂNCER DE MAMA.....	88
5.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	95

## 1.0 INTRODUÇÃO

O câncer é a segunda principal causa de morte em todo o mundo e foi responsável por cerca de 9,6 milhões de mortes no ano 2018. Globalmente, cerca de uma em cada seis mortes tem como etiologia o câncer. Aproximadamente 70 % das mortes por câncer ocorrem em países de baixa e média renda. Cerca de um terço das mortes por câncer se deve aos cinco principais riscos comportamentais e alimentares: alto índice de massa corporal, hábitos alimentares, sedentarismo, tabagismo e consumo de bebidas alcólicas. O câncer também exerce um significativo e crescente impacto econômico na sociedade. Exemplificando, o custo econômico anual total do câncer em 2010 foi estimado em aproximadamente US \$ 1,16 trilhão (WHO, 2018).

Dentre os principais tipos de cânceres, destaca-se o câncer de mama como o mais frequente e a principal causa de morte por tumor entre mulheres em todo o mundo (LEE et al, 2012; CECILIO et al, 2015; WERUTSKY, NUNES e BARRIOS, 2019). No ano de 2011, estimou-se que mais de 500 mil mulheres morreram acometidas pelo câncer de mama (WHO, 2013). Embora o câncer de mama seja considerado uma doença do mundo desenvolvido, aproximadamente 50 % dos casos e 58 % das mortes ocorrem em países menos desenvolvidos (GLOBOCAN, 2008; WHO, 2019). A América Latina apresenta cerca de mais de 100 mil novos casos da doença a cada ano, sendo, aproximadamente, 50 % destes originários no Brasil (LEE et al, 2012).

Nos últimos 20 anos, o país registrou o aumento nas taxas de incidência e mortalidade do câncer de mama. O Brasil, assim como outros países da América Latina, enfrenta uma transição demográfica e epidemiológica e, conseqüentemente, uma maior incidência de doenças não transmissíveis, sendo o câncer uma das mais prevalentes. Além disso, o Brasil possui diversos contextos étnicos, culturais e socioeconômicos, o que resulta em uma diferença regional na distribuição do câncer de mama no território nacional (WERUTSKY, NUNES e BARRIOS, 2019). Adicionalmente, a distribuição da riqueza no país afeta também o acesso aos cuidados de saúde e, conseqüentemente, a saúde geral da população (LEE et al, 2012).

A principal abordagem terapêutica para o tratamento do câncer de mama é a remoção cirúrgica da mama afetada pelo tumor, a mastectomia. No entanto, é um método invasivo e

agressivo, capaz de desencadear reações psicológicas e mudanças comportamentais na mulher, associados principalmente à feminilidade, maternidade e sexualidade. A mastectomia, geralmente é complementada com a radioterapia e a quimioterapia, abordagens igualmente invasivas e agressivas, podendo causar calvície, aumento de peso e outros distúrbios que afetam a identidade feminina, bem como, o organismo como um todo. Vale ressaltar que essas terapias convencionais não são eficazes contra a reincidência do tumor provocada por células metastáticas, portanto não há garantia de cura da doença (ARAÚJO, 2013).

Diante dos elevados gastos gerados com os tratamentos atuais para o câncer de mama, novas terapias estão sendo desenvolvidas. Nesse contexto, insere-se a viroterapia oncolítica, que surge como uma potencial estratégia para eliminar ou reverter o desenvolvimento de um tumor no organismo. Os vírus oncolíticos multiplicam-se seletivamente em células tumorais, lisando-as durante a liberação de uma progênie viral, a qual, por sua vez, é capaz de infectar e eliminar células cancerígenas vizinhas (LEE et al, 2010).

Esta terapia tem demonstrado ser multimodal nos mecanismos antitumorais, pois além dos vírus oncolíticos serem citorreduzores, também confere imunidade anticâncer específica. Outras vantagens da viroterapia oncolítica incluem: liberação de antígenos associados a tumores específicos; inflamação local que amplifica as respostas imunes locais, bem como genes que elevam a imunidade antitumoral poderem ser inseridos facilmente através de vetores virais. Além disso, em contraste com a radioterapia e a quimioterapia, a citorredução através dos vírus oncolíticos não implica em prejuízos para o sistema imune, sendo isto fundamental para a imunidade antitumoral (LI; LIU; STAAL, 2008). Adicionalmente, genes imunossupressores podem ser removidos de seu genoma para otimizar o seu mecanismo de ação como imunógeno (LI et al, 2008).

Dentre os vírus oncolíticos mais estudados para aplicação no câncer de mama, o alphaherpesvírus humano 1 destaca-se como um potencial agente de combate às células metastáticas desse tipo de tumor. O alphaherpesvírus humano 1 reúne características singulares e atraentes para aplicação na viroterapia oncolítica como o fato de infectar uma ampla variedade de tipos celulares; possuir uma infectividade elevada quando comparados com outros vírus oncolíticos, como os adenovírus, por exemplo, e possuir um extenso genoma (152 kb) com vários genes não essenciais que podem ser removidos para a inserção de transgenes terapêuticos (KIMATA et al, 2006).

Nos últimos anos, inúmeros estudos têm demonstrado o potencial oncolítico do alphaherpesvírus humano 1 e, sendo assim, o presente trabalho se propôs a fazer uma revisão sistemática de tais estudos descrevendo o potencial terapêutico dessa espécie de vírus no controle de metástases mamárias.

## **2.0 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Descrever o potencial oncolítico do alphaherpesvírus humano 1 na viroterapia de células metastáticas mamárias.

### 3.0 METODOLOGIA

O presente trabalho, de caráter descritivo, foi elaborado através de uma pesquisa exploratória realizada nas bases de dados: *PubMed*, *Scientific Eletronic Library Online (SCIELO)*, *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* e *Scholar Google*.

As palavras chave utilizadas para a busca de artigos foram: oncolytic viruses, breast cancer, virotherapy oncolytic, virotherapy and breast cancer, Herpesviridae, human alphaherpesvirus 1, human alphaherpesvirus 1 oncolytics, epidemiology of breast cancer, epidemiology of breast cancer in Brazil.

A revisão foi desenvolvida de forma crítica visando selecionar informações atuais, bem como trabalhos antigos, porém referências mundiais na produção científica sobre o tema abordado.

## **4.0 REVISÃO DE LITERATURA**

### **4.1 CÂNCER DE MAMA**

#### **4.1.1 PATOGÊNESE DO CÂNCER**

A palavra câncer possui etimologia no termo grego “*karkínos*”, que significa “caranguejo”, tendo sido utilizada pela primeira vez por Hipócrates (460-377 a.C.), médico grego, considerado como o “pai da medicina”. Sendo assim, percebe-se que o câncer não é uma doença nova, e o fato de ter sido detectado em múmias egípcias corrobora a ideia de que essa doença comprometia o homem há mais de 3 mil anos antes de Cristo (INCA, 2019).

O câncer é conceituado como um conjunto de várias doenças, mais de 100, que se caracterizam por um crescimento desordenado (maligno) de células, responsáveis pela invasão de tecidos e órgãos, que podem, inclusive, espalhar-se para outras regiões do organismo, o que dá origem às metástases (INCA, 2019).

Essa enfermidade é resultante de vários erros e alterações genéticas que se acumulam nas células ao longo do tempo e que acarretam degeneração celular. O câncer ocorre a partir de mutações nos genes de uma única célula, o que a torna capaz de proliferar de maneira rápida, formando assim, uma massa tumoral. A partir dessas mutações, múltiplas transformações ocorrem nessa mesma célula, de tal modo que ela adquire um caráter de malignidade. O Instituto Nacional do Câncer (INCA) explica que ocorre um crescimento diferenciado em células tumorais: elas não entram em senescência seguida de apoptose. Ao invés disso, permanecem crescendo/dividindo de maneira descontrolada, formando várias outras células anormais; ou seja, que se dividem de forma rápida, agressiva e incontrolável (INCA, 2019).

A proliferação celular pode ser controlada ou não controlada. Quando o crescimento é controlado há um aumento localizado e autolimitado do número de células de tecidos normais que formam o organismo, o qual pode ter etiologia fisiológica ou patológica. Nesse caso as células são normais ou com poucas alterações na sua forma e função, podendo ser iguais ou diferentes do tecido onde se instalam. Essas alterações podem ser revertidas após o término dos estímulos que as provocaram. A hiperplasia, a metaplasia e a displasia são exemplos desse tipo de crescimento celular (INCA, 2019).

Em contrapartida, no crescimento não controlado, tem-se uma massa anormal de tecido, no qual o crescimento é praticamente autônomo, persistindo dessa maneira excessiva após a cessação dos estímulos que o originaram. As neoplasias (câncer *in situ* e câncer invasivo) correspondem a essa forma não controlada de crescimento celular e, na prática, são denominadas tumores (Figura 1) (INCA, 2019).

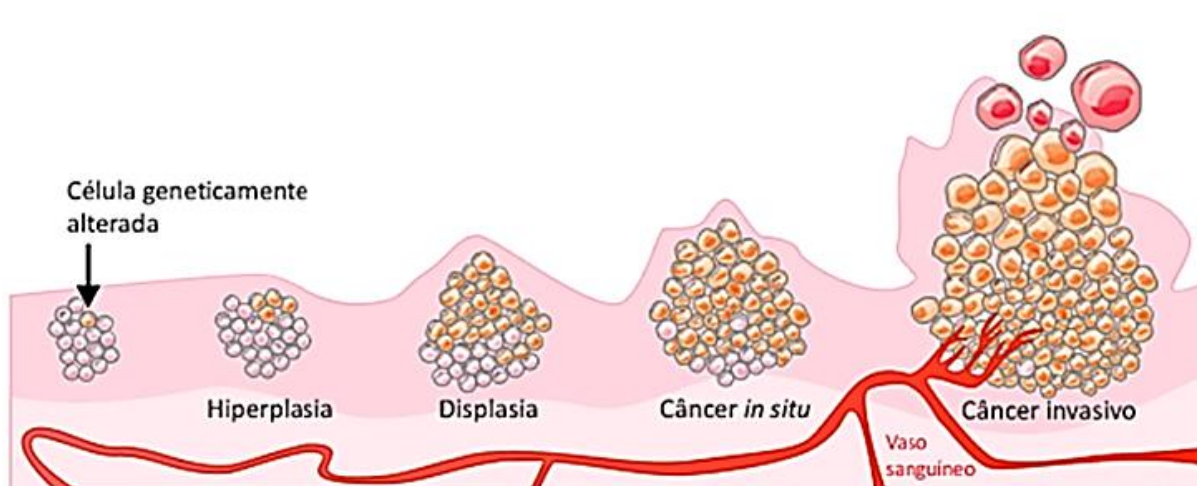
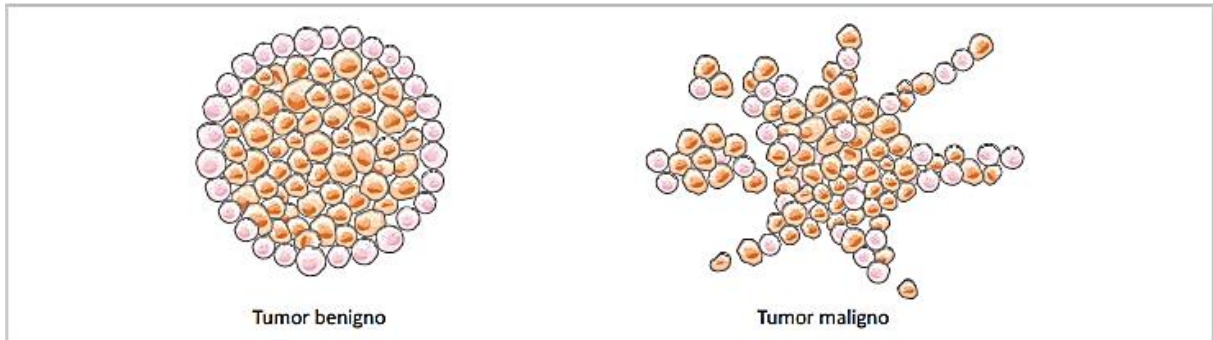


Figura 1. **Tipos de crescimento celular.** A divisão celular pode ser controlada ou não controlada. No caso do crescimento controlado o aumento do número de células é localizado e autolimitado ao tecido à qual a célula geneticamente modificada originou-se. Ainda, as células são normais ou com reduzidas alterações na sua forma e função. A hiperplasia e displasia exemplificam um crescimento controlado. A hiperplasia refere-se a um aumento localizado e autolimitado do número de células de um órgão ou tecido. Essas células são normais na forma e possuem a mesma função das do tecido original. A hiperplasia pode ser fisiológica (normal) ou patológica. Já a displasia é um processo de crescimento celular no qual as células apresentam modificação de algumas de suas características. Nele há alteração da forma e tamanho das células, além da presença frequente de mitoses (divisões celulares). Há um crescimento desordenado do epitélio. Em um crescimento não controlado, se observa uma massa anormal de tecido, no qual a divisão celular é descontrolada e excessiva; mesmo após a cessação dos estímulos que a originou. As neoplasias, câncer *in situ* e câncer invasivo, ou tumores, exemplificam o crescimento celular não controlado. O carcinoma *in situ* ou não invasivo é o primeiro estágio em que o câncer não originário das células do sangue pode ser classificado; sendo as células cancerígenas limitadas à camada da qual elas se desenvolveram e ainda não se espalharam para outras camadas do órgão de origem. Em contrapartida, o câncer invasivo prolifera, invade outras camadas celulares do órgão e ganha a capacidade de se disseminar para outras partes do corpo (metástase) (Adaptado de INCA, 2019).

As neoplasias podem ser benignas ou malignas. Neoplasias benignas apresentam crescimento organizado, geralmente lento, expansivo e possuem limites bem nítidos. Embora não invadam os tecidos vizinhos, podem comprimir os órgãos e tecidos adjacentes. Lipoma (originado no tecido adiposo), mioma (originário do tecido muscular liso) e adenoma (tumor benigno das glândulas) exemplificam os tumores benignos. As neoplasias ou tumores



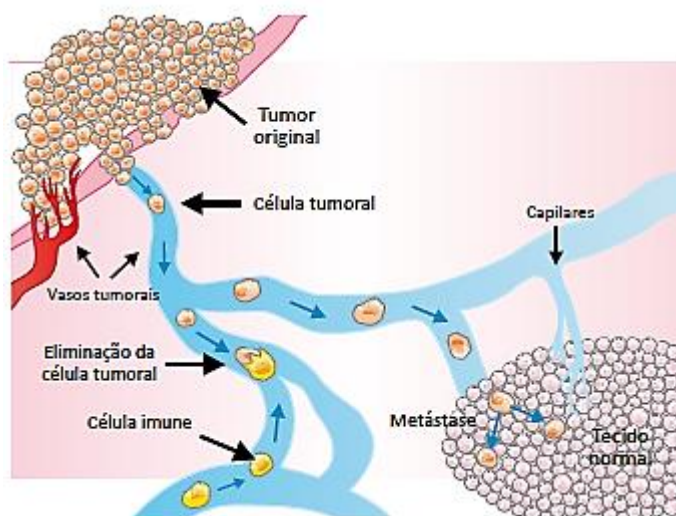
malignos manifestam um maior grau de autonomia e podem invadir tecidos vizinhos e provocar metástases, podendo ser resistentes ao tratamento e causar a morte do hospedeiro. Sendo assim, o câncer, propriamente dito, é uma neoplasia maligna (Figura 2) (INCA, 2019).



**Figura 2. Diferenças entre tipos de tumores.** À esquerda, uma representação de neoplasia benigna, à qual apresenta crescimento organizado e nitidamente delimitado. À direita, um exemplo de uma neoplasia ou tumor maligno, o qual possui crescimento desorganizado, não delimitado e com capacidade invasiva para tecidos e/ou órgãos vizinhos (Adaptado de INCA, 2019).

O câncer não invasivo, denominado também de carcinoma *in situ* é o primeiro estágio em que o câncer pode ser classificado; classificação essa, que não se aplica aos tumores do sistema sanguíneo. Nesse estágio (*in situ*), as células tumorais estão limitadas à camada de tecido na qual se desenvolveram. A maioria dos carcinomas *in situ* são curáveis se tratados antes da progressão para a fase de câncer invasivo (INCA, 2019).

No câncer invasivo, as células cancerígenas invadem outras camadas celulares do órgão, adentram a corrente sanguínea ou linfática e são capazes de se disseminarem para outras regiões do organismo. A principal característica do câncer maligno é a habilidade de invasão e disseminação possibilitando o desenvolvimento de outros tumores, em outras partes do corpo, a partir de um pré-existente. Esses novos focos de doença são denominados de metástases. Essa capacidade invasiva das neoplasias malignas dificulta a erradicação cirúrgica das mesmas (Figura 3) (INCA, 2019).



**Figura 3. Processo de Metástase.** A metástase acontece quando as células tumorais atingem outras regiões do corpo, além do seu local de origem. As células cancerígenas invadem um tecido sadio. Após um período, atravessam as paredes dos vasos sanguíneos ou linfáticos que estejam por perto. Logo após, movem-se por meio do sistema linfático e sanguíneo para outras regiões do corpo. As células estacionam em pequenos vasos, os capilares sanguíneos. A partir desse estágio, invadem suas paredes e migram para novos tecidos, aonde vão se multiplicar formando pequenos tumores, ou micrometástases. Estas, por sua vez, estimulam o crescimento de novos vasos sanguíneos para obter oxigênio por meio do sangue, o necessário para continuar o crescimento do tumor (Adaptado de INCA, 2019).

O câncer possui etiologias variadas, que no geral, podem ser externas ou internas ao organismo. As causas externas estão relacionadas a fatores ambientais e estilo de vida. Enquanto as causas internas referem-se à pré-disposição genética individual, e estão relacionadas à capacidade do organismo de evadir das agressões externas (INCA, 2019).

#### 4.1.2 ASPECTOS BIOLÓGICOS DO CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é uma das neoplasias humanas mais comuns, responsável por aproximadamente um quarto de todos os cânceres em mulheres no mundo e 27% dos cânceres em países desenvolvidos com um estilo de vida ocidental (LAKHANI et al, 2012).

Embora a incidência seja maior no sexo feminino, o câncer de mama também pode ocorrer em homens. Pirhardt e Mercês (2009) afirmam que “o câncer de mama ocorre tanto em mulheres, quanto em homens na proporção de 100/1, ou seja, para cada 100 casos de câncer de mama feminino há um caso de câncer de mama masculino” (PETER e BERNARD, 2008; PIRHARDT e MERCÊS, 2009; MAKKI, 2015).

O tumor de mama pode ocorrer em qualquer uma das células da glândula mamária e exibe um amplo escopo de características morfológicas, diferentes perfis imunohistoquímicos e subtipos histopatológicos únicos que têm curso e resultado clínico específico (MAKKI, 2015).

A histologia mais comum do câncer de mama é o carcinoma ductal invasivo (50-75% das pacientes), seguido por carcinoma lobular invasivo (5-15% das pacientes), com carcinomas ductal/lobular mistos e outras histologias mais raras que acometem as portadoras da doença (DILLON, GUIDI e SCHNITT, 2014; WAKS e WINER, 2019).

A maioria das neoplasias da mama são adenocarcinomas, que constituem mais de 95% dos cânceres de mama. Em geral, o carcinoma de mama é dividido em carcinoma ductal *in situ* (CDIS) e carcinoma ductal invasivo (CDI). O CDIS é caracterizado por uma proliferação de células epiteliais intraductal potencialmente maligna não invasiva que está confinada aos ductos e lóbulos. O CDI refere-se a uma proliferação anormal maligna de células neoplásicas no tecido mamário, capaz de infiltrar através da parede do ducto no estroma. O carcinoma invasivo e o carcinoma *in situ* são classificados como ductal e lobular baseados no local de origem do tumor. Os cânceres originários dos ductos são conhecidos como carcinomas ductais, enquanto os originários dos lóbulos são conhecidos como carcinomas lobulares. Entretanto, foi descoberto que esse tipo de variação do crescimento tumoral pode estar relacionado com o perfil de expressão de caderina-E nas células tumorais (VINAY et al, 2010; MAKKI et al, 2015).

A classificação morfológica do carcinoma mamário pode ser suplementada com a avaliação de parâmetros moleculares, já que podem fornecer uma melhor apreciação da heterogeneidade do tumor de mama e uma melhor previsão do comportamento do câncer para refinar as estratégias terapêuticas. Perou et al (2000) classificaram o tumor mamário em subgrupos distintos, baseados em similaridades nos perfis de expressão gênica, utilizando a tecnologia de microarranjos (PEROU et al, 2000; MAKKI, 2015).

Nesse aspecto, o câncer de mama consiste em três subtipos principais de tumor, categorizados de acordo com a expressão do receptor de estrogênio ou progesterona e a amplificação do gene de fator de crescimento epidérmico (ERBB2) (WAKS e WINER, 2019).

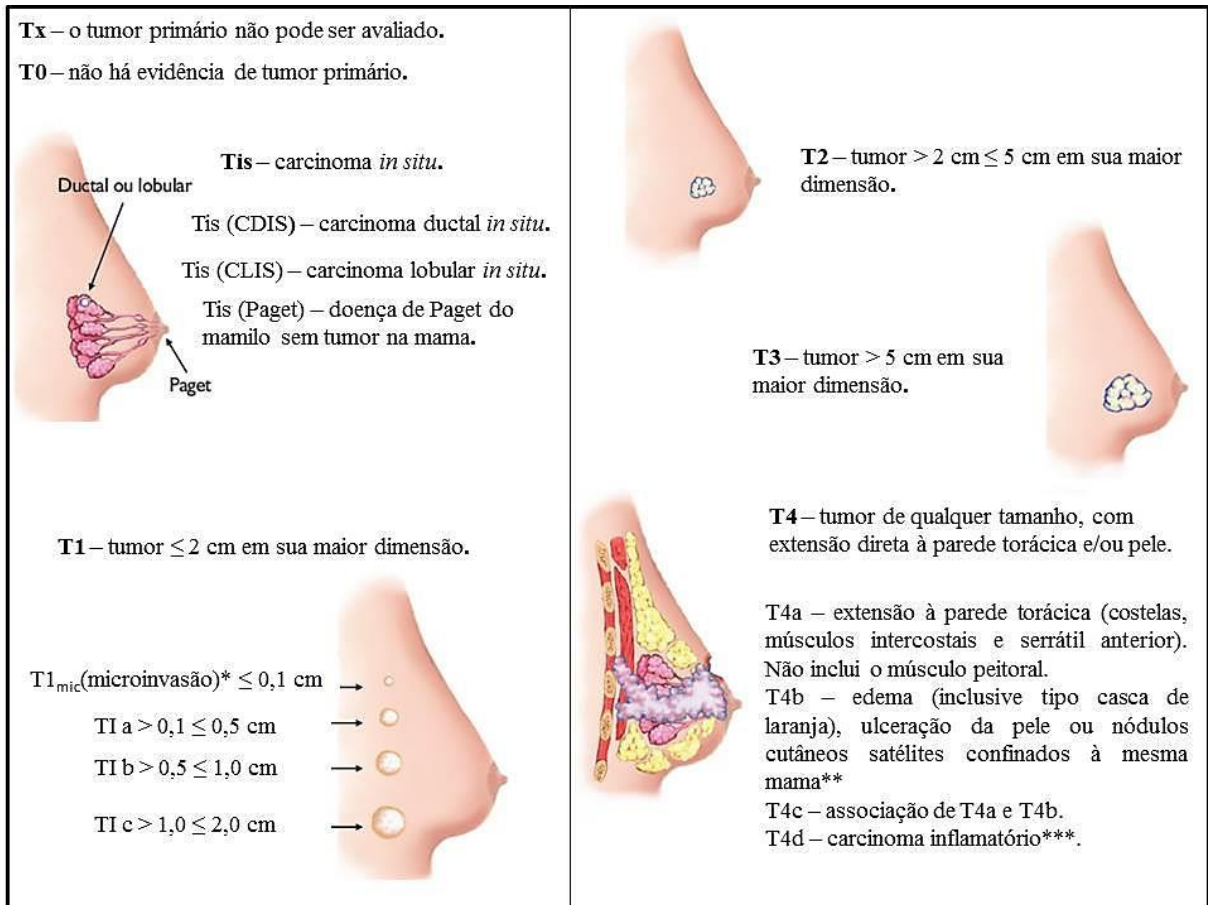
O receptor de estrogênio alfa (ER $\alpha$ ) é expresso em aproximadamente 70% dos cânceres de mama invasivos. ER $\alpha$  é um receptor de hormônio esteroide e um fator de

transcrição que, quando ativado pelo estrogênio, ativa vias de crescimento oncogênico em células tumorais da mama. A expressão do receptor de progesterona (PR), hormônio esteroide estreitamente relacionado, também é um marcador da sinalização de ER $\alpha$  (JOSHI e PRESS, 2018). Tumores que expressam ER $\alpha$  ou PR em pelo menos 1% das células tumorais são categorizados HR+ ou Luminal A (HAMMOND et al, 2010; MAKKI, 2015; WAKS e WINER, 2019).

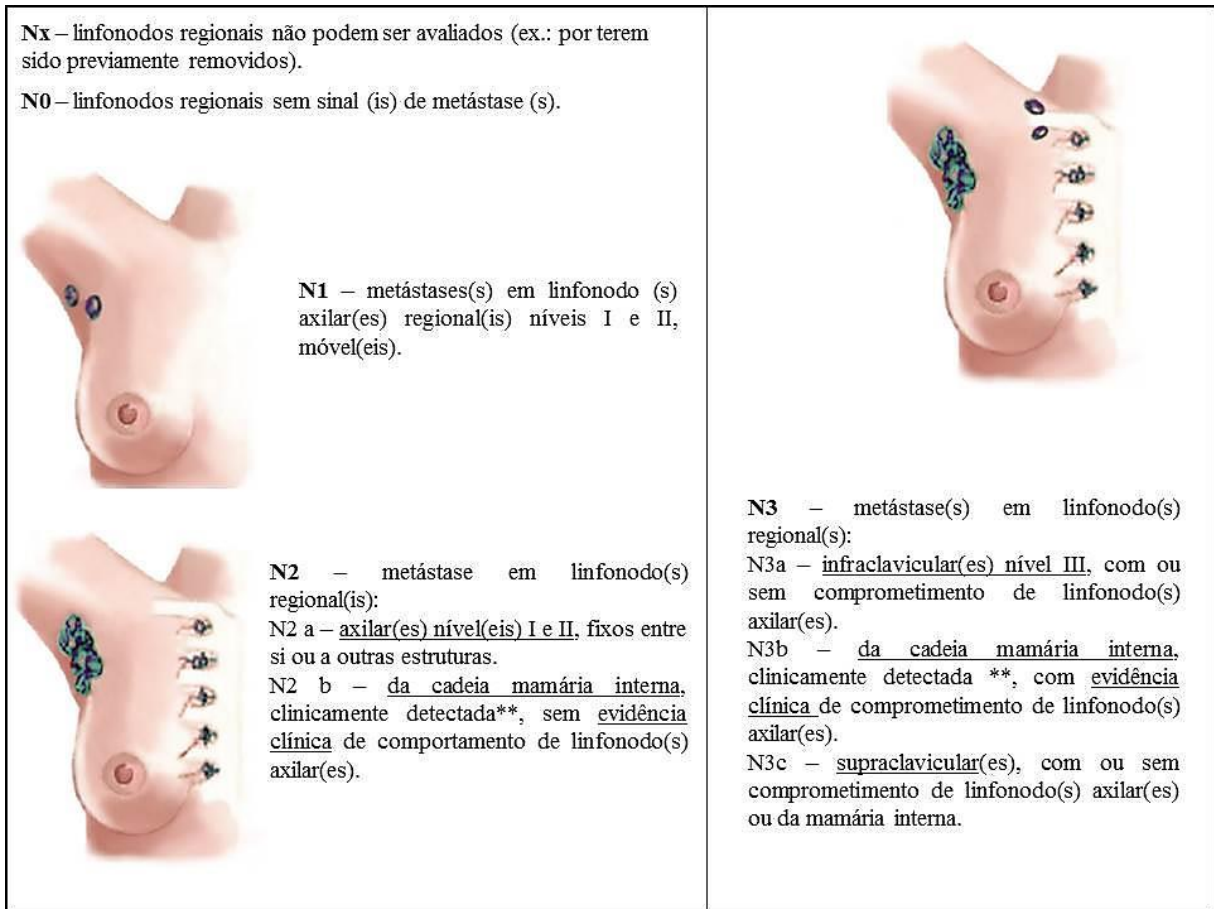
Um segundo subtipo de carcinoma mamário é caracterizado pelo fator de crescimento epidérmico 2 (ERBB2, anteriormente denominado HER2 ou HER2/neu), um receptor transmembranar tirosina quinase na família de receptores de fator de crescimento epidérmico que é superexpresso em aproximadamente 20% dos cânceres de mama (PICCART-GEBHART et al, 2005). Tumores com superexpressão do gene ERBB2 são ERBB2+ ou luminal B (WOLFF et al, 2013; MAKKI, 2015; WAKS e WINER, 2019).

O câncer de mama triplo negativo ou basal like, que representa aproximadamente 15% de todos os tumores da mama, é caracterizado pela ausência de expressão dos alvos moleculares ER, PR ou ERBB2. Os tumores triplos negativos apresentam alto risco de reincidência nos primeiros 3 a 5 anos após o diagnóstico. A fisiopatologia molecular específica do câncer de mama triplo negativo permanece pouco compreendida (FOULKES, SMITH e REIS-FILHO, 2010; MAKKI, 2015; DENKERT et al, 2017; WAKS e WINER, 2019).

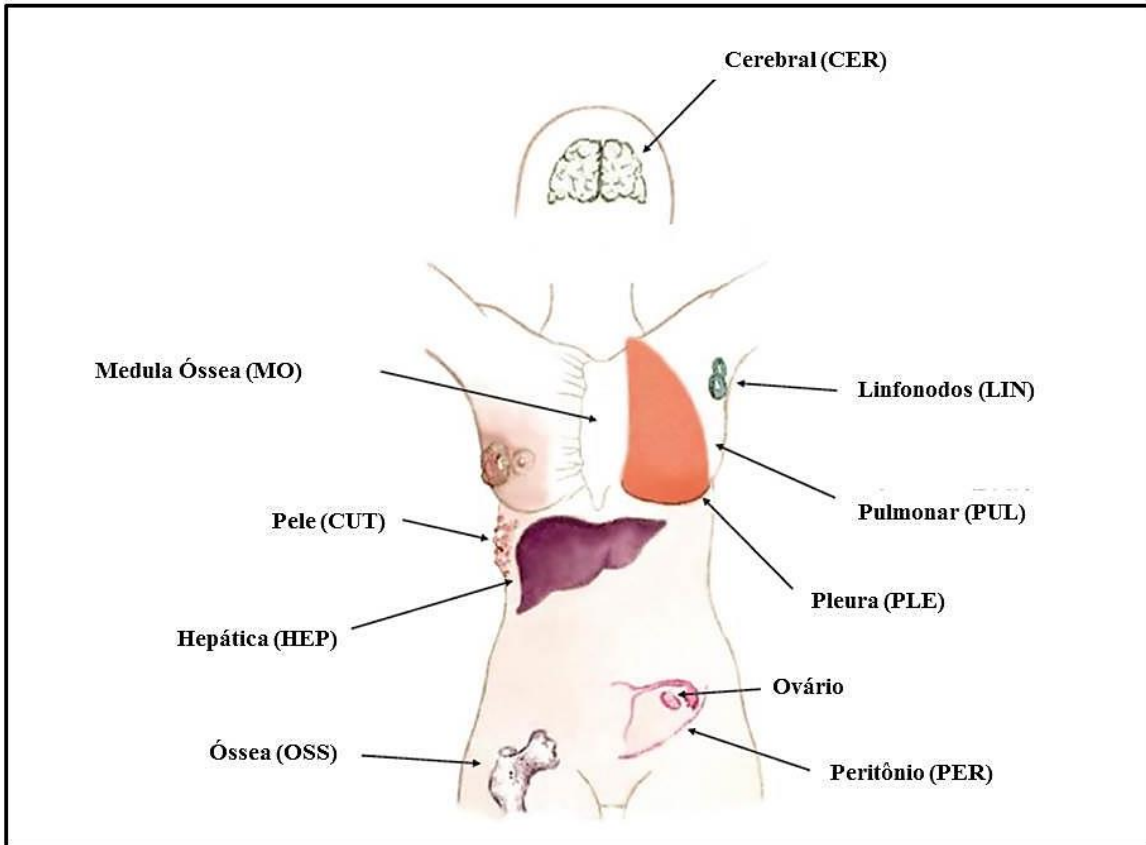
O sistema de estadiamento mais utilizado é o preconizado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC), denominado Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos. Esse sistema baseia-se na extensão anatômica da doença, levando em conta as características do tumor primário (T), as características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza (N) e a presença ou ausência de metástase a distância (M). Esses parâmetros recebem graduações, geralmente de T0 a T4; N0 a N3; e de M0 a M1, respectivamente (SINN e KREIPE, 2013; GIULIANO et al, 2017; INCA, 2019). As figuras 4, 5 e 6 exemplificam a classificação TNM para tumores malignos de mama, e a tabela 1 os grupos de câncer de mama por estadiamento da doença (INCA, 2019).



**Figura 4. TNM - Classificação Clínica de Tumores Malignos da Mama (T – Tumor Primário).** O sistema TNM para descrever a extensão anatômica da doença tem por base a avaliação de três componentes: T – a extensão do tumor primário, N – a ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais e M – a ausência ou presença de metástases à distância. A adição de números a estes três componentes indica a extensão da doença maligna. Dessa maneira tem-se: TX – o tumor primário não pode ser avaliado; T0 – não há evidência de tumor primário; Tis – Carcinoma *in situ*; T1, T2, T3 e T4 – tamanho crescente e ou extensão local do tumor primário. Notas: \* Microinvasão – invasão das células neoplásicas além da membrana basal, para os tecidos adjacentes, com nenhum foco maior que 0,1 cm em sua maior dimensão. Quando há vários focos, somente o tamanho do maior é usado para classificar a microinvasão. \*\* Invasão da derme – por si só não qualifica como T4. \*\*\* Carcinoma inflamatório – endurecimento difuso da pele, com borda erisipeloide e frequentemente sem massa subjacente. (Adaptado de INCA, 2019).



**Figura 5. TNM - Classificação Clínica de Tumores Malignos da Mama (N – Linfonodos Regionais\*).** NX – os linfonodos regionais não podem ser avaliados; N0 – Ausência de metástase em linfonodos regionais; N1, N2 e N3 – Comprometimento crescente dos linfonodos regionais. A extensão direta do tumor primário para o linfonodo é classificada como metástase linfonodal. Notas: \*Linfonodos regionais ou homolaterais – são aqueles localizados no mesmo lado do tumor na mama. Quando em outras localizações, são codificados como metástase(s) (MI), inclusive os cervicais, supra e infraclaviculares e mamários internos contralaterais. \*\*Metástase clinicamente detectada – é assim definida quando detectada por exame clínico ou por estudos de imagem (excluindo linfocintigrafia), com características altamente suspeitas de malignidade, identificadas no exame citológico de material, obtido por aspiração com agulha fina. É designada com o sufixo (f)[ex.: cN3a (f)] (Adaptado de INCA, 2019).



**Figura 6. TNM - Classificação Clínica de Tumores Malignos da Mama (M – Metástases a Distância).**

Metástase em qualquer linfonodo que não seja regional é classificada como metástase à distância. MX – A presença de metástase à distância não pode ser avaliada; M0 – Ausência de metástase à distância e M1 – metástase à distância. A categoria M1 pode ser ainda especificada de acordo com as seguintes notações, segundo a localização da metástase: Pulmonar (PUL), Medula Óssea (MO), Óssea (OSS), Pleural (PLE), Hepática (HEP), Peritoneal (PER), Cerebral (CER), Supra-renal (ADR), Linfonodal (LIN), Pele (CUT) e Outras (OUT). (Adaptado de INCA, 2019).

**TABELA 1. GRUPOS POR ESTÁDIOS DE CÂNCER DE MAMA**

<b>GRUPAMENTOS POR ESTÁDIOS</b>				
<b>Estádio</b>		<b>Tumor</b>	<b>Linfonodo</b>	<b>Metástase</b>
<b>0</b>		Tis	N0	M0**
<b>I</b>	<b>IA</b>	TI*	N0	M0
	<b>IB</b>	T0	N1mic	M0
		T1	N1mic	M0
<b>II</b>	<b>II A</b>	T0	NI	M0
		TI*	NI	M0
		T2	N0	M0
	<b>II B</b>	T2	N1	M0
		T3	N0	M0
<b>III</b>	<b>IIIA</b>	T0	N2	M0
		TI*	N2	M0
		T2	N2	M0
		T3	NI	M0
		T3	N2	M0
	<b>IIIB</b>	T4	N0	M0
		T4	NI	M0
		T4	N2	M0
	<b>IIIC</b>	Qualquer T	N3	M0
<b>IV</b>		Qualquer T	Qualquer N	MI***

**Fonte:** \*TI inclui TI mic. \*\*M0 – ausência de metástase à distância. \*\*\*M1 – metástase à distância. Modificado de INCA, 2019.

A observação do fato de que, em algumas famílias, a ocorrência de muitos casos de câncer de mama e ovário aumentavam as chances de desenvolvimento da doença nas gerações subsequentes levou os pesquisadores a estudar a possibilidade de haver herança genética envolvida no processo (ANDERSON, 1992). Dois genes de suscetibilidade ao câncer de mama que estão envolvidos na manutenção da estabilidade do ácido desoxirribonucleico (DNA) foram identificados com mutações que podem levar à síndrome hereditária de cânceres de mama e ovário: o BRCA 1 e o BRCA 2 (EASTON, 1995; WOOSTER et al, 1995; INCA 2019).



Mutações em BRCA 1 e BRCA 2 são encontradas em 40 e 30% dos cânceres de mama familiares, respectivamente. Os riscos cumulativos de câncer de mama em portadores das mutações BRCA 1 e BRCA 2 são de 50 e 70%, respectivamente (BERRY et al, 1997; BURKE et al, 1997; COUCH et al, 1997). Mutações no gene BRCA 2 ocorrem com mais frequência no câncer de mama masculino, quando comparado como BRCA 1. Portadores da mutação BRCA 1 apresentam resultados mais sérios do que portadores de BRCA 2, mesmo quando o câncer é detectado em estágios iniciais; o câncer de mama em portadores de BRCA 1 geralmente está associado ao envolvimento dos linfonodos axilares (N+) nos estágios iniciais, bem como à falta de receptor de estrogênio (ER negativo) e receptor de progesterona (PR) (FUCKAR et al, 2006; PARSA et al, 2016).

#### **4.1.3 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA NO MUNDO**

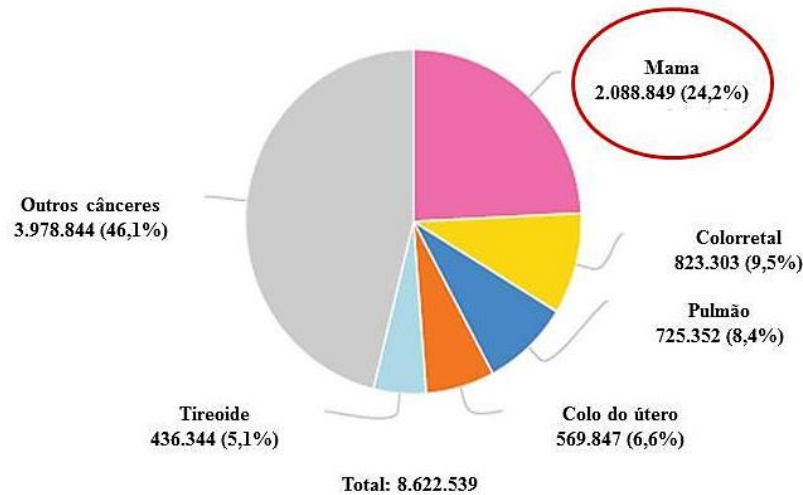
Atualmente o peso das doenças não transmissíveis cresce em todo mundo e está associado a fatores como o aumento na expectativa de vida e exposição prolongada a fatores de risco decorrentes de mudanças no estilo de vida. Estudos recentes demonstram que o câncer é uma das enfermidades mais relevantes no mundo, e por ser multifatorial, se torna complexa em uma visão epidemiológica (GHONCHEH, POURNAMDAR, SALEHINIYA, 2016).

Estima-se que a carga global do câncer tenha aumentado para 18,1 milhões de novos casos e 9,6 milhões de mortes em 2018. No mundo, o número total de pessoas que estarão vivas dentro de 5 anos após um diagnóstico de câncer, indicador chamado de prevalência de 5 anos, é estimado em 43,8 milhões (WHO, 2018). Ainda, estima-se que o número de mortes atinja 11 milhões até 2030 (MOMENIMOV AHED e SALEHINIYA, 2019).

Nesse contexto, o câncer de mama é o segundo câncer mais comum e representa 25 % de todos os tipos de tumores, com 1,7 milhão de novos casos por ano, possuindo uma elevada taxa de incidência em todos os países do mundo. Dessa forma, o câncer de mama é o mais frequente em 154 dos 185 países incluídos no GLOBOCAN 2018 (GHONCHEH, POURNAMDAR, SALEHINIYA, 2016; MOMENIMOV AHED e SALEHINIYA, 2019).

O câncer de mama é o câncer mais comum e uma das principais causas de morte entre as mulheres (TAO et al, 2015; GHONCHEH, POURNAMDAR, SALEHINIYA, 2016;

WHO, 2018; MOMENIMOVAHED e SALEHINIYA, 2019). Estima-se que 24 %, ou seja, cerca de 1 em cada 4 casos de câncer diagnosticados em mulheres no mundo são de câncer de mama (Figura 7) (GHONCHEH, POURNAMDAR, SALEHINIYA, 2016; WHO, 2018; MOMENIMOVAHED e SALEHINIYA, 2019).



**Figura 7.** Dados mundiais referentes ao número de novos casos de cânceres mais frequentes em mulheres no ano de 2018. Em destaque, o câncer de mama foi o tumor que mais acometeu o sexo feminino. (Adaptado de WHO, 2019).

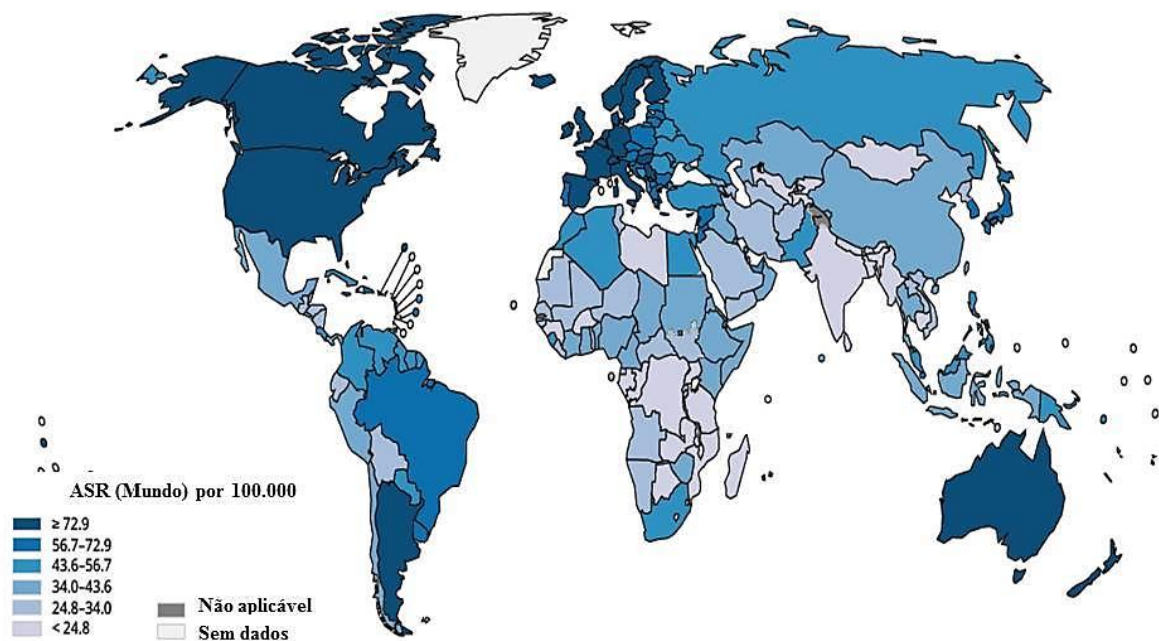
Embora a doença apresente uma ocorrência mundial, suas taxas de incidência, mortalidade e sobrevida variam consideravelmente entre diferentes partes do mundo, o que pode ser devido a múltiplos fatores, como estrutura populacional, estilo de vida, fatores genéticos e ambientais. Esses fatores contribuíram para o aumento na prevalência de câncer de mama com uma taxa de incidência estimada em 3,2 milhões para 2050 (TAO et al, 2015; MOMENIMOVAHED e SALEHINIYA, 2019).

A taxa de incidência do câncer de mama é maior em países desenvolvidos podendo variar muito em função da etnia, e, portanto entre diferentes regiões do mundo (TAO et al, 2015; GHONCHEH, POURNAMDAR, SALEHINIYA, 2016; MOMENIMOVAHED e SALEHINIYA, 2019). No geral, a incidência (taxa padronizada por 100.000) do câncer de mama em regiões mais desenvolvidas corresponde a 74,1, enquanto que, em regiões menos desenvolvidas essa taxa corresponde a 31,3 (MOMENIMOVAHED e SALEHINIYA, 2019).

Na África e leste da Ásia, por exemplo, a taxa de incidência varia de 27 por 100 mil para 92 por 100 mil na América do Norte. Quase 24 % de todos os casos de câncer de mama

do mundo ocorrem na região Ásia-Pacífico, com as maiores taxas observadas na China, Japão e Indonésia (MOMENIMOVAHED e SALEHINIYA, 2019). Além do Japão, a prevalência de câncer de mama tem aumentado entre mulheres asiáticas e americanas, com a Coreia representando a maior prevalência de câncer de mama no período entre 1988-2006 e Sudeste Asiático em 1988-2013. Estima-se que 277.054 novos casos de câncer de mama foram diagnosticados no leste asiático em 2012 (MOMENIMOVAHED e SALEHINIYA, 2019).

Na Europa Ocidental a incidência do câncer de mama equivale a (96 por 100 mil), na América do Norte (91,6 por 100 mil), no Norte da Europa (89,4 por 100 mil), na Austrália/Nova Zelândia (85,8 por 100 mil), no Sul da Ásia Central (28,2 por 100 mil) e no leste da Ásia (27 por 100 mil) (MOMENIMOVAHED e SALEHINIYA, 2019). A incidência mundial do câncer de mama padronizada por faixa etária é visualizada na figura 8 (WHO, 2019).



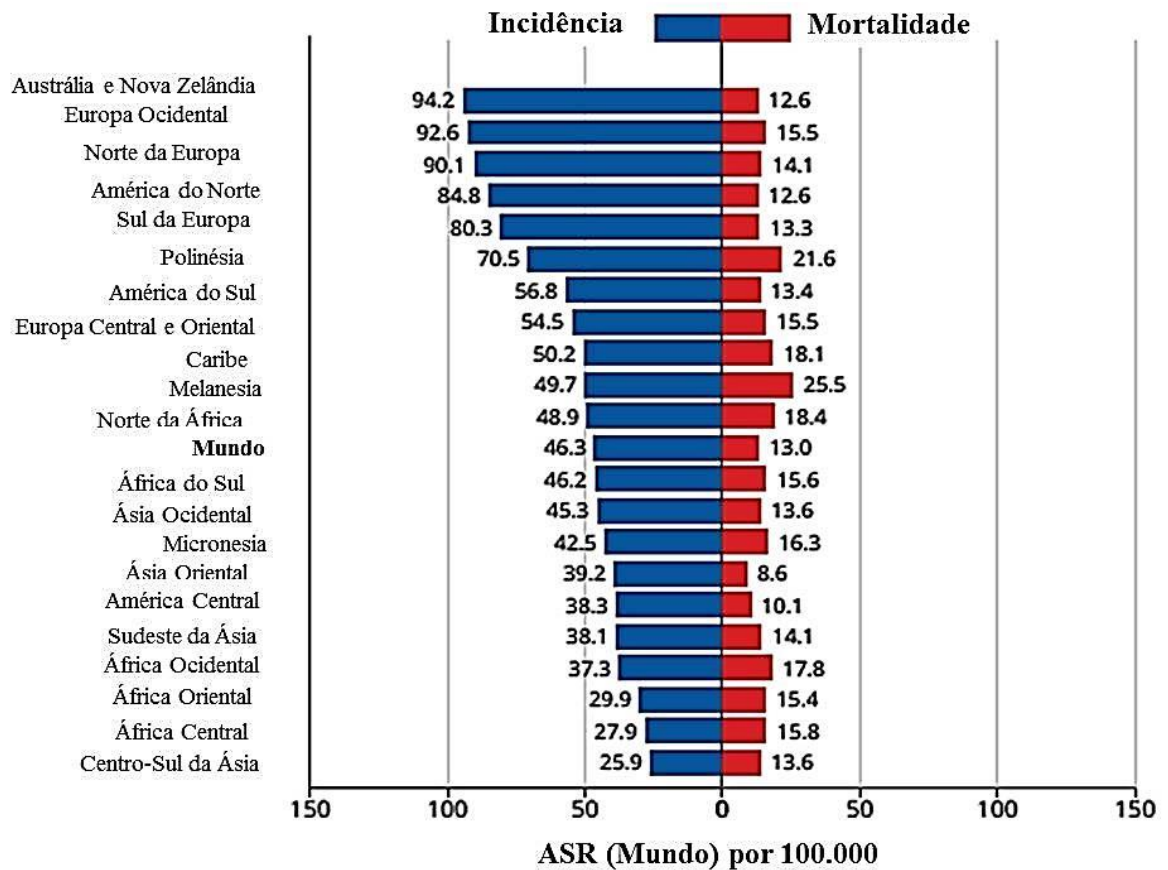
**Figura 8.** Taxas de incidência do câncer de mama no mundo por idade padronizada, todas as idades (Adaptado de WHO, 2019).

Embora a incidência de câncer de mama esteja aumentando em todo o mundo, existem desigualdades significativas entre países ricos e pobres, com as taxas de incidência permanecendo mais altas em regiões mais desenvolvidas, enquanto as taxas de mortalidade

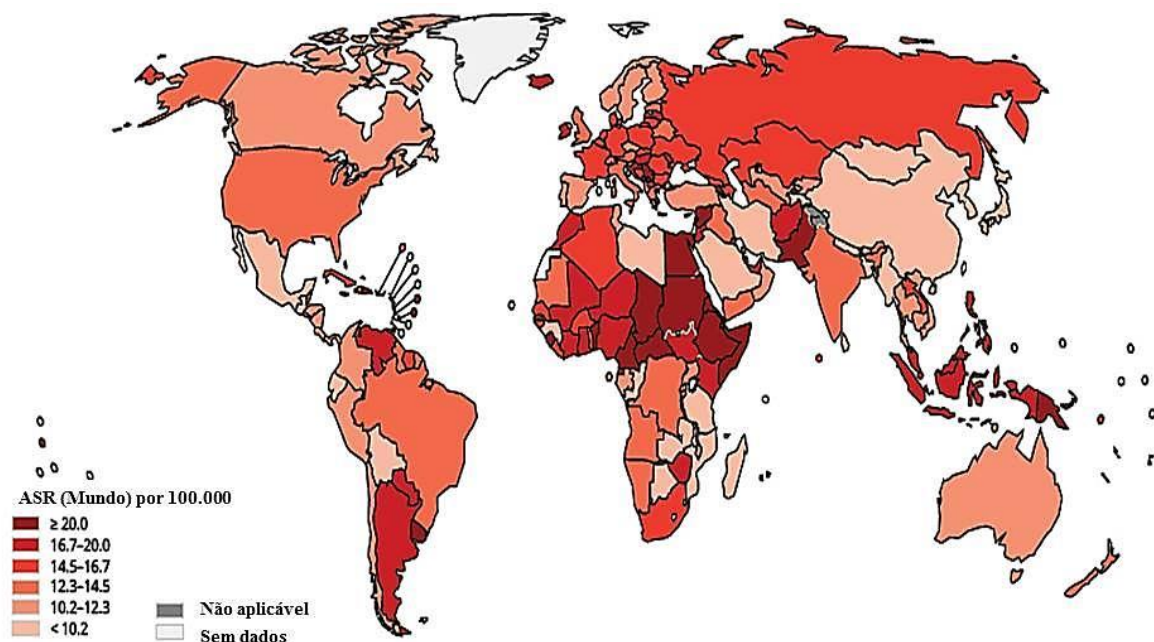
são muito maiores em países menos desenvolvidos (TAO et al, 2015; MOMENIMOVAHED e SALEHINIYA, 2019).

A taxa de mortalidade com etiologia no câncer de mama é maior nos países em desenvolvimento, nos quais cerca de 70 % das mulheres vêm a óbito. A sobrevida em 5 anos varia de cerca de 80% nos países desenvolvidos, 60 % nos países emergentes e 40 % em países subdesenvolvidos (LEE et al, 2012; CECILIO et al, 2015). Mulheres residentes em países de baixa renda, especialmente na África, geralmente iniciam o tratamento em estágios avançados da doença, quando outros órgãos também são afetados. No Quênia e em Uganda, por exemplo, quase todas as mulheres são diagnosticadas tardiamente, fator associado a uma mortalidade mais elevada. Em contraste, na Inglaterra e na Austrália, o número de casos diagnosticadas no terceiro e quarto estágios da doença é menor que o número relatado em países em desenvolvimento (GHONCHEH, POURNAMDAR, SALEHINIYA, 2016).

Devido à atualização de métodos diagnósticos e melhora terapêutica do câncer de mama nos países de renda alta, observou-se uma redução significativa na taxa de mortalidade por câncer de mama nesses países. A taxa de mortalidade padronizada por idade (ASMR) do câncer de mama no mundo é de 12,9 variando de 6 casos a cada 100.000 pessoas no leste da Ásia a 20/100.000 na África Ocidental. As figuras 9 e 10 mostram a incidência e a mortalidade mundial do câncer de mama padronizado por idade segundo o GLOBOCAN, 2018 (WHO, 2019).



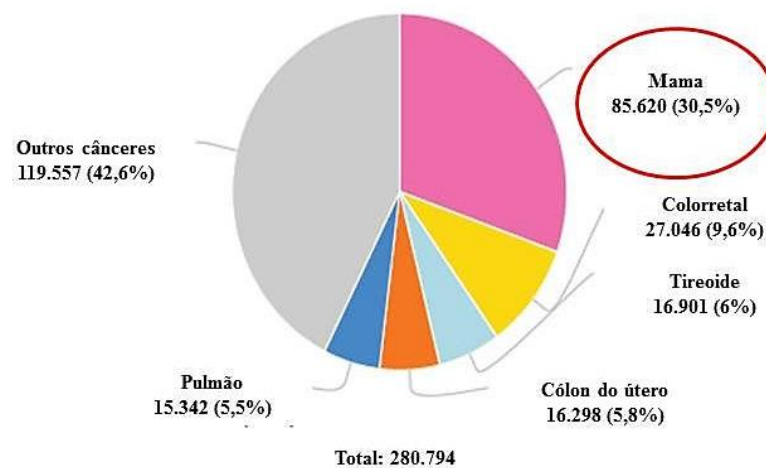
**Figura 9.** Incidência e mortalidade mundial do câncer de mama, por idade padronizada. (Adaptado de WHO, 2019).



**Figura 10.** Taxas de mortalidade mundiais do câncer de mama padronizadas por idades, para todas as idades. (Adaptado de WHO, 2019).

#### 4.1.4 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA NO BRASIL

Estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) apontam para o tumor de mama como a principal neoplasia maligna em mulheres brasileiras e a principal causa de morte por câncer no país (CECILIO et al, 2015), com 59700 novos casos diagnosticados em 2018; excluindo o câncer de pele não melanoma (WERUTSKY, NUNES e BARRIOS, 2019). A figura 11 mostra o número de novos casos de cânceres diagnosticados em mulheres de todas as idades no Brasil, em 2018 (WHO, 2019). Santos (2018) corrobora esses dados ao demonstrar que o câncer de mama representa 29,5 % dos casos de tumores femininos no país, seguido pelo câncer de colo-retal (9,4 %), cervical (8,1 %), câncer de pulmão (6,2 %) e tumor da tireoide (4 %).

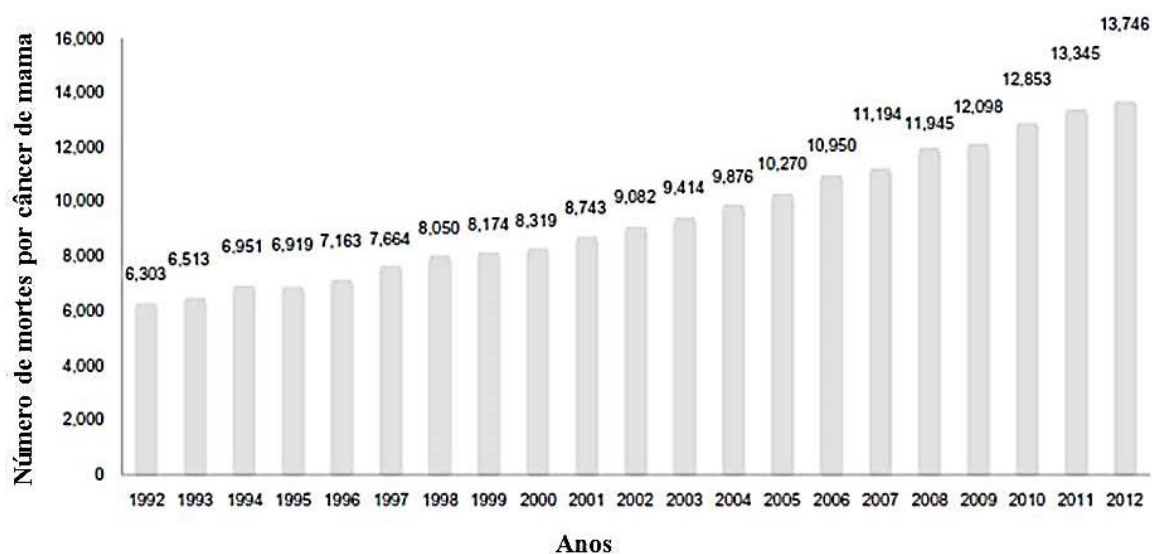


**Figura 11:** Número de novos casos de cânceres em mulheres brasileiras para o ano de 2018. Em destaque, o câncer de mama foi o tumor mais frequente entre as brasileiras (Adaptado de WHO, 2019).

A análise da distribuição da incidência de câncer por região geográfica mostra que 70 % dos novos casos de câncer ocorrem nas regiões sul e sudeste. O padrão de incidência de câncer nessas regiões se assemelha ao relatado para os países desenvolvidos, onde os tipos de câncer de próstata, mama feminina, pulmão e colo-retal são os predominantes (SANTOS, 2018). Nos últimos 20 anos, as taxas de incidências, assim como as de mortalidade por câncer de mama, aumentaram no Brasil. No período de 2006 a 2016, a taxa de incidência teve um aumento anual de 2,54 % (WERUTSKY, NUNES e BARRIOS, 2019).

A maior incidência de câncer de mama no país é observada no sul do Brasil (LEE et al, 2012; CECILIO et al, 2015). Em Porto Alegre (Rio Grande do Sul), a incidência estimada para 2010 foi a mais alta no país (127,7 novos casos para 100 mil mulheres). Em contraste, alguns estados do norte têm incidências quase dez vezes menores, como a cidade de Palmas (Tocantins), onde a incidência anual é estimada em 13 novos casos por 100 mil mulheres (LEE et al, 2012). Essa mesma heterogeneidade de distribuição do câncer de mama nas diferentes regiões geográficas do país, foi relatada anteriormente por Moraes (1998), no qual as taxas de incidência variavam de 29,15 casos por 100 mil mulheres na região Norte para 66,12 casos por 100 mil mulheres na região Sul (CECILIO et al, 2015). Essa disparidade regional na distribuição do câncer de mama no Brasil pode estar relacionada aos diversos contextos étnicos (48 % caucasianos; 44 % multirraciais e 7 % afrodescendentes), culturais e socioeconômicos do país (LEE et al, 2012; CECILIO et al, 2015).

Em 2010, estima-se que 13.000 mulheres morreram por câncer de mama no Brasil (LEE et al, 2012). O total estimado de mortes em 2016 foi de 17.018 óbitos (WERUTSKY, NUNES e BARRIOS, 2019). Pôde-se observar o aumento progressivo das taxas de mortalidade por tumor de mama no país. O número de óbitos causados por câncer de mama no Brasil durante o período de 1992 a 2012 é visualizado na figura 12 (CECILIO et al, 2015). Foi registrado o aumento de 12,2 % na mortalidade associada à doença no intervalo de 1990 e 2015 (WERUTSKY, NUNES e BARRIOS, 2019).



**Figura 12:** Taxas de mortalidade por câncer de mama no Brasil no período de 1992 a 2012 (Cecilio et al, 2015).



Ao avaliar o perfil dos óbitos por câncer de mama no Brasil (Tabela 2), observa-se que a taxa de óbito mais elevada corresponde à faixa etária que varia de 50 a 69 anos (45,5 % dos casos) (CECÍLIO et al, 2015).

**TABELA 2. Número de mortes associadas ao câncer de mama e grupos etários específicos no período de 1992 a 2012.**

<b>Idade do Grupo (anos)</b>	<b>Número de mortes por câncer de mama</b>	<b>%</b>
30-39	14.374	7,1
40-49	37.279	18,6
50-59	48.910	24,5
60-69	41.975	21,0
70-79	32.346	16,7
Mais de 80	22.825	11,4

**Fonte:** Modificado de Cecilio et al, 2015.

O estadiamento TNM (tumor, nódulo, metástase) de mulheres diagnosticadas com câncer de mama no Brasil é apresentado predominantemente como doença avançada. Um estudo prospectivo do Grupo de Estudos do Câncer de Mama (GBECAM) avaliou dados epidemiológicos de mulheres diagnosticadas com câncer de mama em todas as regiões brasileiras e mostrou que cerca de 40 % das mulheres diagnosticadas eram encenadas no TNM III-IV. Os resultados revelaram ainda que a mediana de idade no diagnóstico desses pacientes é de 58 anos (CECILIO et al, 2015).

O estudo Amazona, o maior estudo de coorte retrospectivo do Brasil realizado pelo GBECAM, incluiu 3142 pacientes diagnosticadas com câncer de mama em dois períodos de 2001 e 2005 (WERUTSKY, NUNES e BARRIOS, 2019). Em toda a população estudada, a distribuição dos estágios foi: 20 % estágio I, 48 % estágio II, 28 % estágio III e 5 % estágio IV. Quase 33 % das pacientes diagnosticados através do sistema de saúde público estavam em estágio III, em contraste com 16 % diagnosticadas através do sistema privado. Portanto, os pacientes do sistema público de saúde apresentaram uma taxa mais alta de doença do câncer de mama localmente avançado, provavelmente devido ao menor nível de escolaridade e ao fraco acesso a programas de rastreamento para o câncer de mama (LEE et al, 2012; WERUTSKY, NUNES e BARRIOS, 2019).

Além disso, também existem diferenças regionais em termos de estágio de diagnóstico no Brasil. No norte do país, apenas 8,4 % das mulheres foram diagnosticadas com doenças em estágio I e até 46,2 % foram diagnosticadas com doenças em estágio III-IV. A região mais endêmica também apresentava taxas mais baixas de doença estágio I (12,3 %) e



altas taxas de doença estágio III-IV (31,9 %). Essas taxas contrastam com 24,7 % para a doença estágio I e 25,1 % para a doença estágio III-IV no sul (LEE et al, 2012; WERUTSKY, NUNES e BARRIOS, 2019).

Quanto à distribuição dos subtipos moleculares, diferenças regionais também são observadas. Dados do estudo Amazona constataram que quase 70 % das pacientes são diagnosticadas com receptor de estrogênio (ER) / receptor de progesterona (PR) positivo para o câncer de mama, e cerca de 20 % com HER-2 positivo (ER/ PR positivo ou negativo) e 21 % com triplo subtipo negativo. No entanto, observa-se um maior índice de mulheres diagnosticadas com triplo-negativo de câncer de mama no norte e centro-oeste do que em outras regiões, bem como as positivas para luminal e HER-2, são mais frequentes nas regiões sul e sudeste (WERUTSKY, NUNES e BARRIOS, 2019).

Adicionalmente, estudos moleculares detectaram a presença de relevantes modificações genéticas conhecidas em tumores de mama, como mutações no gene BRCA, especialmente no Brasil. O BRCA é o principal gene conhecido que confere suscetibilidade ao câncer de mama. Dufloth et al (2005) relataram uma prevalência de 13 % de mutações BRCA1/BRCA2 em mulheres brasileiras diagnosticadas com câncer de mama na região sul (CECILIO et al, 2015). Outros estudos, agora com o objetivo de realizar um perfil de famílias em risco de câncer de mama e ovário hereditário (HBOC) encontraram uma prevalência de 3,4 % a 21,5 % de pacientes portadores de mutações BRCA1/BRCA2 (CECILIO et al, 2015; WERUTSKY, NUNES e BARRIOS, 2019). Ainda mais importante é a descrição abrangente do espectro de mutações da BRCA germinativa em diferentes regiões geográficas brasileiras, que mostrou heterogeneidade molecular significativa nos genes BRCA1 e BRCA2 entre os portadores brasileiros (WERUTSKY, NUNES e BARRIOS, 2019).

#### **4.1.5 TRATAMENTOS DISPONÍVEIS PARA O CÂNCER DE MAMA**

A escolha da melhor associação de terapias considera o estadiamento clínico e/ou patológico, o tipo histológico, a presença de ER e PR, a superexpressão do ERBB 2 no tumor e o estado de saúde do paciente (COATES, 2015; NCCN, 2018; WAKS e WINER, 2019; INCA, 2019). O tratamento do câncer de mama pode ser classificado como sistêmico, quando

se utilizam quimioterapia, hormonioterapia e/ou terapia-alvo molecular e local (cirúrgico, radical ou conservador; e radioterápico) (NCCN, 2018).

Para o câncer de mama não metastático, os principais objetivos da terapia consistem em erradicar o tumor e linfonodos regionais, além de prevenir a ocorrência de metástase. A terapia local para o câncer de mama não metastático consiste em ressecção cirúrgica e amostragem ou remoção de linfonodos axilares, com possibilidade de radiação pós-operatória. A terapia sistêmica pode ser pré-operatória (neoadjuvante), pós-operatória (adjuvante) ou ambas (WAKS e WINER, 2019; INCA, 2019) e consiste em: terapia endócrina para todos os tumores de HR+ (com alguns pacientes necessitando também de quimioterapia), terapia de anticorpos dirigida por ERBB2 baseada em trastuzumabe e quimioterapia para todos os tumores ERBB2+ e quimioterapia isolada para o câncer de mama triplo-negativo (WAKS e WINER, 2019).

A terapia endócrina, que neutraliza o crescimento de tumores promovidos por estrogênio, é a terapia sistêmica primária para o câncer de mama HR+/ERBB2-. Esse tratamento consiste em medicamentos anti-estrogênio orais tomados diariamente por 5 anos, e as opções diferem de acordo com o status da menopausa. Os inibidores de aromatase (anastrozol, exemestano e letrozol) diminuem os níveis circulantes de estrogênio, o que inibe a conversão de androgênios em estrogênios e são eficazes apenas em mulheres na pós-menopausa (HARBECK e GNANT, 2017; JOSHI e PRESS, 2018).

O tamoxifeno também pode ser utilizado na terapia endócrina para paciente com tumor mamário HR+, reduzindo a taxa de recorrência do câncer de mama em aproximadamente 50% nos primeiros cinco anos após o diagnóstico. Contudo, a terapia endócrina pode apresentar alguns efeitos adversos desfavoráveis; alguns mais comuns, como ilhas de calor e artralrias ou mialgias, e outros mais raros como, câncer de útero, doença tromboembólica ou fratura óssea relacionada à osteoporose (MOURIDSEN et al, 2009; DAVIES et al, 2011; EBCTCG, 2015). Adicionalmente, a extensão da terapia endócrina (além dos 5 anos) fornece pequenos benefícios, mas agrega toxicidade e, portanto, merece consideração em pacientes de alto risco (WAKS e WINER, 2019).

A quimioterapia é a única terapia sistêmica com eficácia demonstrada para o câncer de mama triplo negativo e um complemento importante à terapia endócrina ou terapia dirigida ao ERBB2 em pacientes com câncer de mama HR+/ERBB2- ou ERBB2+, respectivamente. Ainda, apesar dos riscos associados a curto e longo prazo, continua sendo também a

terapêutica essencial para prevenir a recorrência em muitos pacientes com câncer de mama em estágio I-III. No geral os esquemas docetaxel/ciclofosfamida, adriamicina/ciclofosfamida, ciclofosfamida/metotrexato/5-fluorouracil, antraciclina e taxano são os quimioterápicos mais utilizados para o tumor de mama; tanto na terapia neoadjuvante quanto na adjuvante (WAKS e WINER, 2019).

Especificamente, o uso de antraciclina parece ser mais relevante em pacientes com tumor mamário triplo negativo e em pacientes com envolvimento linfonodal (BLUM et al, 2017). Assim como na terapia endócrina, a quimioterapia também apresenta toxicidades inerentes a essa terapêutica, dentre eles: astenia, mielosupressão, neuropatia sensorial, mortalidade cardíaca (por exemplo, relacionada à adriamicina), neutropenia febril e outros (JONES et al, 2006; PETO et al, 2012; BLUM et al, 2017).

O tratamento do câncer de mama metastático tem como objetivo terapêutico prolongar a vida dos pacientes e o controle dos sintomas. Atualmente, o câncer de mama metastático permanece incurável em praticamente todos os pacientes afetados. As mesmas categorias básicas de terapia sistêmica são usadas no câncer de mama metastático e nas abordagens neoadjuvantes e adjuvantes. Modalidades de terapia local (cirurgia e radiação) são normalmente usadas para o controle apenas em doenças metastáticas (WAKS e WINER, 2019).

O tratamento cirúrgico do câncer de mama evoluiu nas últimas décadas, com avanços destinados a minimizar as sequelas cosméticas e funcionais de longo prazo da terapia local. As cirurgias podem ser conservadoras, quando apenas uma parte da mama é retirada, ou radicais, quando toda a mama é retirada, sendo possível realizar, posteriormente, a reconstrução mamária (INCA, 2019). As abordagens padrão consistem na mastectomia total ou uma excisão (lumpectomia) mais radiação. Foi demonstrado que essas duas abordagens consistentemente são equivalentes em relação à sobrevida livre de recaída e em geral (FISHER et al, 2002). As contra indicações à cirurgia conservadora incluem: (1) a presença de microcalcificações suspeitas difusas na imagem mamária; (2) margens patológicas positivas após a mastectomia; (3) doença não passível de tratamento por excisão de uma única região do tecido mamário com resultado cosmético satisfatório, exceto em pacientes altamente selecionados; (4) algumas doenças vasculares do colágeno, como esclerodermia; e (5) radioterapia prévia à mama envolvida (NCCN, 2018).

Há apenas algumas décadas atrás, mulheres diagnosticadas com câncer de mama foram tratadas com mastectomia radical, incluindo dissecação dos linfonodos axilares (ALND), para obter um controle locorregional adequado e permitir a recuperação total. Embora esse objetivo do tratamento permaneça válido, a abordagem cirúrgica deve ser mais conservadora e seletiva, tanto no que diz respeito aos linfonodos mamários quanto aos axilares. O impacto da qualidade de vida do paciente na cirurgia se manifesta com procedimentos menos mutilantes ou com a aplicação de novas técnicas que permitam proporcionar um efeito cosmético satisfatório na aparência do paciente (MURAWA et al, 2014).

O tratamento cirúrgico dos linfonodos axilares deve ser considerado separadamente da terapia cirúrgica da mama. A remoção do linfonodo serve tanto a um objetivo diagnóstico (determinando a extensão anatômica do câncer de mama) quanto a um propósito terapêutico (remoção de células cancerígenas). A tomada de decisão cirúrgica baseia-se no envolvimento do linfonodo axilar no momento do diagnóstico e na administração de terapia sistêmica neoadjuvante (WAKS e WINER, 2019).

A radioterapia no câncer de mama pode ser aplicada em toda a mama ou em uma parte da mama (após a mastectomia), na parede torácica (após a mastectomia) e nos gânglios linfáticos regionais. A radiação da mama inteira pós-lumpectomia é um componente padrão da terapia de preservação da mama (FISHER et al, 2002).

Com relação às abordagens de radioterapia para o câncer de mama, há desenvolvimentos conflitantes a serem observados: estratégias menos invasivas de radioterapia foram estabelecidas, como irradiação parcial da mama (WHELAN et al, 2010; BARRY, HO e MORROW, 2013), ou radioterapia hipofracionada (HAVILAND et al, 2013) que diminuem a carga do paciente (MARTA et al, 2015). A radioterapia intraoperatória tem sido usada como impulso (SEDLMAYER et al, 2014) ou radioterapia isoladamente (MALUTA et al, 2014), ambas novamente visando reduzir efeitos colaterais e esforços logísticos para os pacientes. Embora um pequeno benefício numérico possa existir em termos de controle local, também para pacientes em idade avançada, por exemplo, maiores de 70 anos, é altamente improvável que essa diferença se traduza em diferença relevante na sobrevivência a longo prazo (POETTER et al, 2007; HUGHES et al, 2013; KUNKLER et al, 2015; HARBECK e GNANT, 2017).

Como mencionado anteriormente, os atuais tratamentos para o câncer de mama são citotóxicos e baseados em terapias hormonais e imunoterapias; todas elas demonstrando eficácia limitada em estágios avançados do tumor de mama. Com terapias sistêmicas agressivas, as pacientes, na maioria das vezes, são expostas a uma alta toxicidade, podendo afetar o sistema cardíaco e neurológico, bem como induzir o desenvolvimento de novos cânceres primários (MOLS, 2005; TAYLOR, McGALE e DARBY, 2006; ANDERSON et al, 2006; BIRD e SWAIN, 2008; AZIM et al, 2011; MOLS et al, 2014). Em contrapartida, a taxa de resposta observada é inferior ou aproximada a 50% (GONZALEZ-ÂNGULO, MORALES-VASQUEZ e HORTOBAGYI, 2007).

Combinações terapêuticas têm sido utilizadas para elevar a eficácia no tratamento do câncer de mama. Contudo, os tumores continuam a desenvolver resistência, acarretando reincidências das células cancerígenas. Desse modo, surge uma alta demanda de novas terapias para o tratamento sistêmico do câncer de mama avançado. Nesse contexto, uma nova abordagem terapêutica ganhou considerável atenção: a viroterapia oncolítica (O'BRYAN e MATHIS, 2018).

## **4.2 VIROTERAPIA ONCOLÍTICA**

### **4.2.1 BREVE HISTÓRIA DOS VÍRUS ONCOLÍTICOS**

O efeito antitumoral da infecção viral natural em pacientes com câncer foi constatado pela medicina há mais de um século (DOCK, 1904; BIERMAN et al, 1953; PELNER, FOWLER e NAUTS, 1958; CHOI et al, 2016). Contudo, somente nos últimos 25 anos existiram avanços palpáveis na elucidação de como os vírus oncolíticos funcionam e interagem com o sistema imunológico, a partir daí foi possível avaliar o papel dos vírus oncolíticos em testes clínicos para humanos (CHOI et al, 2016).

Ainda que os vírus tenham sido utilizados como agentes terapêuticos na forma de vacinas desde o final dos anos 1700 (PASTEUR, 1885; WILLIS, 1997; CHOI et al, 2016), seu potencial como agente anticâncer não havia sido explorado até o surgimento de relatos de casos de remissões de câncer, após a infecção concomitante com doenças virais naturalmente adquiridas (DOCK, 1904; BIERMAN et al, 1953; PELNER, FOWLER e NAUTS, 1958; CHOI et al, 2016). Dock (1904) descreve o caso de uma mulher de 42 anos que sofria de

leucemia e apresentou remissão de tumor após contrair gripe. Em outro caso, um menino de quatro anos com leucemia sofreu remissão notável após adquirir catapora (BIERMAN et al, 1953).

Inicialmente, vários ensaios clínicos em humanos identificaram tanto o potencial da terapia viral como tratamento do câncer, quanto seus indesejáveis efeitos colaterais (HOSTER et al, 1949; SOUTHAM e MOORE, 1952; GEORGIADES et al, 1959; ASADA, 1974; CHOI et al, 2016). Embora alguns pacientes apresentassem remissão clínica de curta duração de seus tumores, vários deles morreram pelos efeitos colaterais da terapia viral (hepatite ou neuroencefalite fatal) (HOSTER et al, 1949; SOUTHAM e MOORE, 1952); ou teve as breves remissões revertidas por uma forte resposta anamnésica pelo sistema imunológico, resultando na progressão do câncer e morte (GEORGIADES et al, 1959; ASADA, 1974).

Estas observações sugeriram que os vírus naturalmente possuíam uma capacidade inata de eliminar células cancerígenas, porém para aproveitar o potencial oncolítico dos vírus, seriam necessárias alterações para melhorar a sua seletividade pelas células cancerígenas, e consequentemente, sua eficácia (CHOI et al, 2016). O desenvolvimento da engenharia genética na década de 1990 possibilitou a alteração dos genomas virais (CHEN e SZALAY, 2011) e, consequentemente, contribuiu para melhorar a seletividade tumoral e diminuir a toxicidade. Martuza et al (1991) relataram que o tratamento com alphaherpesvírus humano 1 deletado para o gene da timidina quinase (TK) poderia reduzir o glioma em cérebros de camundongos com neurotoxicidade reduzida (CHOI et al, 2016).

Desde então, o desenvolvimento da viroterapia oncolítica do laboratório ao leito foi finalmente realizado. Até o momento, dois vírus oncolíticos geneticamente modificados foram aprovados para comercialização como drogas. Um deles, o Oncorine (H101, o mesmo construto que ONYX-015) (HEISE et al, 1997), um adenovírus multado que foi aprovado na China para câncer de cabeça, pescoço e esôfago em 2005 (XIA et al, 2004; GARBER, 2006; FUKUHARA, INO e TODO, 2016; GOPISANKAR e SURENDIRAN, 2018).

Após um estudo de fase III, mostrando uma taxa de resposta duradoura para o tratamento de melanoma, em outubro de 2015 o alphaherpesvírus humano 1 expressando o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) denominado comercialmente de T-VEC (talimogene laherparepvec, Amgen, Inc., Thousand Oaks, CA, EUA) foi o primeiro vírus oncolítico aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA para o tratamento do melanoma avançado (ANDTBACKA et al, 2015). Posteriormente,

no ano de 2016, o T-VEC foi aprovado na Europa e na Austrália (COFFIN, 2016; FUKUHARA, INO e TODO, 2016; GOPISANKAR e SURENDIRAN, 2018).

A aprovação do T-VEC pelo FDA corresponde a um grande marco para o campo da viroterapia oncolítica, estabelecendo os vírus oncolíticos como uma nova classe de agentes terapêuticos para o câncer nos EUA (PETERS et al, 2016; CHOI et al, 2016).

#### **4.2.2 VÍRUS ONCOLÍTICOS**

A viroterapia oncolítica representa uma abordagem terapêutica emergente contra o câncer, que resulta da junção entre a terapia biológica e a imunoterapia (CHOI et al, 2016). Isto porque, os vírus oncolíticos promovem respostas antitumorais por meio de um mecanismo de ação duplo: morte seletiva de células cancerígenas e indução de imunidade antitumoral sistêmica (KAUFMAN, KOHLHAPP e ZLOZA, 2015; LAWER et al, 2017). Desse modo, a imunoterapia com vírus oncolíticos utiliza vírus competentes para multiplicação com a finalidade de eliminar células tumorais (ZEYAULLAH et al, 2012; RUSSELL, PENG e BELL, 2014; GOPISANKAR e SURENDIRAN, 2018).

Um vírus oncolítico é definido como um vírus natural ou geneticamente modificado que possui a capacidade de multiplicar-se, seletivamente, em células cancerígenas e eliminá-las, sem acarretar prejuízo aos tecidos saudáveis (FUKUHARA, INO e TODO, 2016). Esses vírus são projetados para utilizar estratégias de direcionamento transcricional e transducional que restringem a multiplicação de vetores oncolíticos à células cancerígenas (O'BRYAN e MATHIS, 2018).

Uma grande variedade de vírus com distintas propriedades têm demonstrado características oncolíticas. O vírus do sarampo, por exemplo, leva a formação de sincícios fusogênicos e morte celular (MSAOUEL et al, 2013). Uma variante desse vírus que expressa o symporter sódio/iodeto humano SLC5A5 (MV-NIS) está sendo testada em vários ensaios clínicos (MSAOUEL, DISPENZIERI e GALANIS, 2009); o MV-NIS permite a visualização de células infectadas e o monitoramento da progressão do tratamento, bem como a radioviroterapia com o iodeto de sódio marcado com I 131. Dados clínicos corroboram a segurança e demonstram imagens de infecção por vírus e regressão tumoral com esta abordagem (GALANIS, ATHERTON e MAURER, 2015; LAWER et al, 2017).

Outro exemplo é o coxsackievirus que possui propriedades oncolíticas e desenvolve uma resposta imune robusta (KEMBALL, ALIREZAEI e WHITTON, 2010). O coxsackievirus A21 do tipo selvagem tem sido usado em ensaios clínicos com o nome Cavatak, para o tratamento do melanoma. O vírus da poliomielite também tem demonstrado propriedades oncolíticas em estudos pré-clínicos e tem atraído atenção devido aos resultados iniciais em tumores cerebrais. Estes estudos foram realizados usando o PVS-RIPO, que foi modificado para eliminar a neurovirulência do vírus nativo. O PVS-RIPO é um vírus citotóxico e imunoestimulador com relatórios preliminares de respostas radiográficas e clínicas duradouras no glioblastoma recorrente (VIRALYTICS, 2015; LAWER et al, 2017).

Os retrovírus são agentes potencialmente úteis, devido à capacidade de infectar ativamente células mitóticas e espalhando-se rapidamente, embora sem necessariamente causar lise celular (TAI e KASAHARA, 2008). A amostra Toca511 é derivada do vírus da leucemia murina modificado para expressar a enzima levedura citosina desaminase, responsável por converter a 5-fluorocitosina em um metabólito tóxico. Estudos realizados em camundongos com gliomas implantados demonstraram uma sobrevivência em longo prazo e desenvolvimento de imunidade antitumoral sistêmica mediada por células T de memória (PEREZ et al, 2012; HUANG et al, 2015; LAWER et al, 2017).

O vírus da estomatite vesicular (VSV) também apresenta propriedades oncolíticas. A seletividade desse vírus depende da sinalização deficiente de interferon (LICHTY et al, 2004; HASTIE e GRDZELISHVILI, 2012). Atualmente, um variante desse vírus que superexpressa o interferon  $\beta$  está sendo testada clinicamente como terapia para o câncer de fígado. É sugerido que o interferon proteja as células normais da infecção ao mesmo tempo, que provoca a destruição específica das células tumorais e as respostas imunitárias (LAWER et al, 2017).

#### **4.2.2.1 MECANISMO DE AÇÃO DOS VÍRUS ONCOLÍTICOS**

A maioria dos vírus oncolíticos estudados até o momento, eliminam diretamente as células tumorais hospedeiras através da multiplicação viral. A multiplicação seletiva dos vírus oncolíticos no interior da célula cancerígena leva à lise da célula tumoral infectada e propagação viral para as células adjacentes e distantes do tumor (FARIA, 2010). O efeito dessa atividade é influenciado pela eficiência do direcionamento de receptores celulares,



replicação viral e elementos de resposta antiviral da célula hospedeira (ALVAREZ-BRECKENRIDGE, KAUR e CHIOCCA, 2009; UCHIDA, 2013).

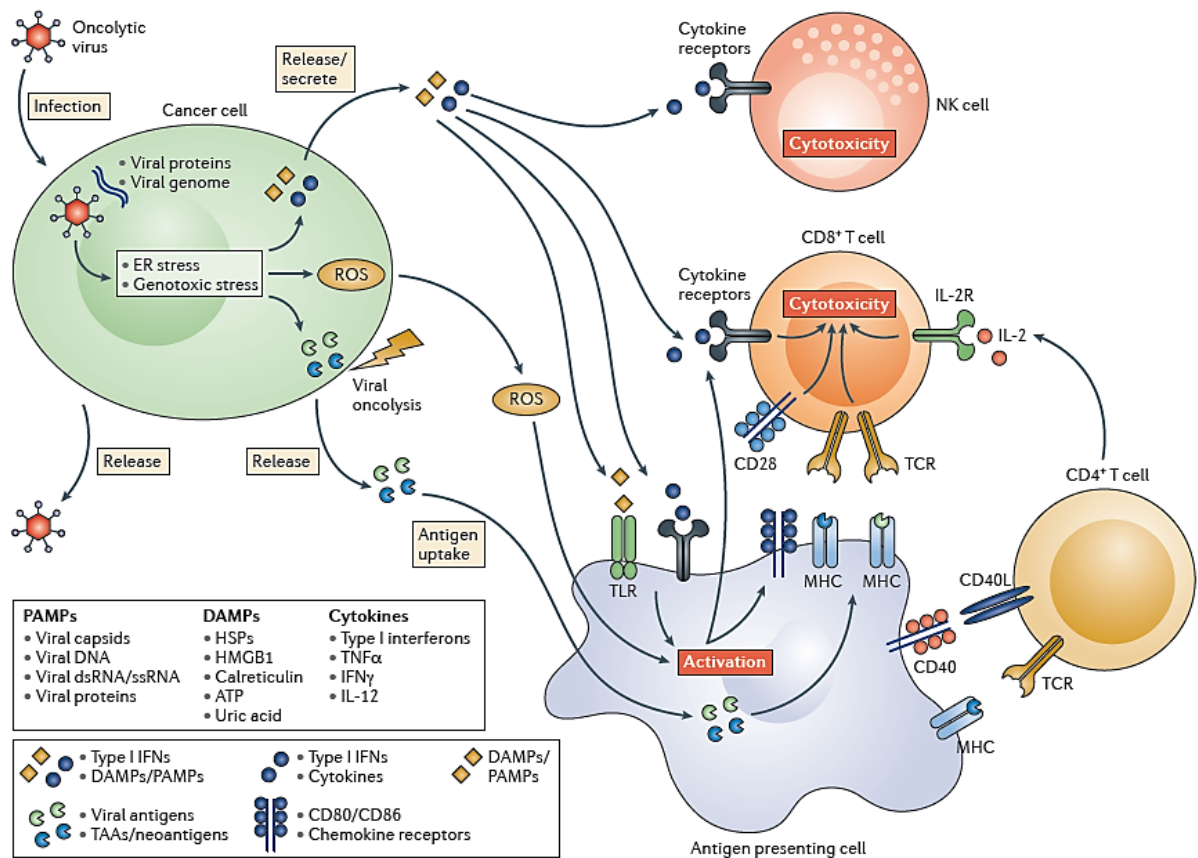
O potencial lítico dos vírus oncolíticos também depende do tipo de vírus; dose infecciosa; tropismo viral natural; e induzido e da susceptibilidade da célula cancerosa a diferentes formas de morte celular (apoptose, necrose, piroptose e autofagia). A necrose ou piroptose, por exemplo, são formas mais imunogênicas de morte celular do que a apoptose, visto que conduz à ativação de ambas as respostas imunes, inata e adaptativa (KAUFMAN, KOHLHAPP e ZLOZA, 2015).

Vale ressaltar que o vírus oncolítico assume e controla o mecanismo molecular de morte celular da célula tumoral infectada, permitindo que a morte ocorra somente, após os recursos celulares disponíveis terem sido exauridos para a síntese de uma nova progênie viral (RUSSEL, PENG e BELL, 2014).

Como mencionado anteriormente, o mecanismo de ação também envolve a estimulação do sistema imune, que é desencadeada pela liberação de restos celulares e antígenos virais no microambiente tumoral (LAWER et. al, 2017).

Após a morte das células tumorais via atividade oncolítica do vírus, as células cancerígenas liberam antígenos associados a tumores que podem promover uma resposta imunológica adaptativa capaz de mediar a regressão do câncer em locais distantes do tumor. Durante a infecção, a presença de PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) e DAMPs (padrão molecular associados ao perigo) e a liberação de citocinas, como interferon (IFN) do tipo I, fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ), IFN $\gamma$  e interleucina-12 (IL-12) promovem a maturação de células apresentadoras de antígenos (APCs), como as células dendríticas (KAUFMAN, KOHLHAPP e ZLOZA, 2015).

As células dendríticas, por sua vez, ativam respostas de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> específicas. Uma vez ativadas, as células T CD8<sup>+</sup> podem se expandir para células efetoras citotóxicas com a capacidade de trafegar para locais de crescimento tumoral estabelecido, onde elas medeiam à imunidade antitumoral após o reconhecimento do antígeno (Figura 13) (KAUFMAN, KOHLHAPP e ZLOZA, 2015).



**Figura 13. Indução de imunidade antitumoral local e sistêmica por vírus oncolíticos.** A eficácia terapêutica dos vírus oncolíticos é determinada por uma combinação de lise celular direta do câncer com a ativação indireta de respostas imunes antitumorais. Após a infecção com um vírus oncolítico, as células cancerígenas iniciam uma resposta antiviral que consiste no retículo endoplasmático (RE) e no estresse genotóxico. Esta resposta leva à regulação positiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ao início da produção de citocinas antivirais. As ROS e as citocinas, especificamente os interferons (IFNs) do tipo I, são liberadas da célula cancerígena infectada e estimulam as células do sistema imune (células apresentadoras de antígeno, células T CD8 + e células natural killer (NK)). Subsequentemente, o vírus oncolítico causa oncólise, que libera a progênie viral, padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), sinais de padrão molecular associados ao perigo (DAMPs) e antígenos associados a tumores (TAAs). A liberação da progênie viral propaga a infecção com o vírus oncolítico. Os PAMPs (consistindo de partículas virais) e DAMPs (compreendendo proteínas da célula hospedeira) estimulam o sistema imunológico após reconhecimento pelos receptores Toll-like (TLRs). No contexto do ambiente imune estimulador resultante, TAAs e neo-antígenos são liberados e absorvidos por células apresentadoras de antígenos. Coletivamente, esses eventos resultam na geração de respostas imunes contra células tumorais infectadas por vírus, bem como respostas imunológicas *de novo* contra TAAs / neo-antígenos exibidos em células cancerosas não infectadas. CD40L, ligando de CD40; dsRNA, RNA de cadeia dupla; HMGB1, grupo de alta mobilidade caixa 1; HSP, proteína de choque térmico; IL-2, interleucina-2; IL-2R, receptor IL-2; MHC, complexo principal de histocompatibilidade; ARNsi, ARN de cadeia simples; TCR, receptor de células T; TNF $\alpha$ , fator de necrose tumoral- $\alpha$  (KAUFMAN, KOHLHAPP e ZLOZA, 2015).

A resposta imune também tem sido associada a um efeito de espectador “imuno-associado”, no qual a liberação local de perforinas citotóxicas e granzimas pode resultar na morte de células tumorais próximas, mesmo na ausência de expressão direta do antígeno (SCHIETINGER et al, 2010). Isto é distinto do efeito espectador do vírus, que está relacionado à multiplicação do vírus no interior das células tumorais e a sua propagação para células cancerígenas previamente não infectadas (KAUFMAN, KOHLHAPP e ZLOZA, 2015).

Um elemento crítico para a erradicação de tumores com vírus oncolíticos é a indução de resposta imune sistêmica, inata e adaptativa específica para o tumor. Contudo, essa resposta depende de uma interação complexa entre a imunidade anticâncer e a imunidade antiviral. Por um lado, os vírus podem auxiliar promovendo uma resposta imune contra as células tumorais, permitindo a apresentação de antígenos cancerígenos no contexto de uma infecção viral ativa. Por outro lado, as respostas antivirais neutralizantes podem bloquear a multiplicação do vírus e a infecção contínua das células tumorais. Os fatores que influenciam o equilíbrio entre o clearance viral imunomediado e a indução da imunidade antitumoral, ainda não estão completamente compreendidos (KAUFMAN, KOHLHAPP e ZLOZA, 2015).

#### **4.2.2.2 TROPISMO NATURAL DOS VÍRUS ONCOLÍTICOS**

Embora os vírus oncolíticos tenham habilidade para infectar tanto células saudáveis quanto células tumorais, as anormalidades inerentes à resposta das células cancerígenas ao estresse, à sinalização celular e à homeostase proporcionam uma vantagem seletiva para a multiplicação viral (HANAHAN e WEINBERG, 2011; KAUFMAN, KOHLHAPP e ZLOZA, 2015; CHOI et al, 2016).

Muitos, se não a maioria dos vírus de ocorrência natural, possuem um tropismo preferencial, mas não exclusivo, para tumores e células cancerígenas. Isto porque, a grande maioria dos tumores evoluiu de forma a burlar a detecção ou destruição imunológica e também resistir a apoptose e supressão translacional, que são as principais respostas utilizadas pelas células normais para neutralizar uma infecção viral (RUSSEL, PENG e BELL, 2014). De fato alguns vírus exploram, naturalmente, as vias de sinalização que mantêm o crescimento sustentado do câncer, a fim de infectar e multiplicar seletivamente em células neoplásicas, em oposição às células normais (CHOI et al, 2016).

O tropismo dos vírus oncolíticos pela célula tumoral tem origem em vários fatores. Em primeiro lugar, os receptores para os distintos tipos de vírus oncolíticos são altamente expressos em células tumorais (LAWER et al, 2017). Por exemplo, o alphaherpesvírus humano 1 utiliza o mediador de entrada de herpesvírus (HVEM) e nectinas selecionadas para o processo de adsorção à célula. Esses receptores de superfície são superexpressos em algumas células tumorais, incluindo o melanoma e vários carcinomas (YU et al, 2005). O coxsackievirus, também exemplifica o tropismo dos vírus oncolíticos. Ele penetra nas células do hospedeiro através da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1; também conhecida como CD54) e fator de aceleração de decaimento (DAF; também conhecido como CD55), que podem ser superexpressas em tumores como mieloma, melanoma e câncer de mama (SHAFREN et al, 2004; AU et al, 2007; GUO et al, 2014).

Segundo, as células cancerígenas possuem uma alta taxa de multiplicação celular e uma elevada atividade metabólica e replicativa, favorecendo a multiplicação viral, quando comparadas com células quiescentes normais. Além disso, as mutações responsáveis por causarem tumores, elevam a especificidade, e logo, a seletividade da multiplicação viral nas células tumorais (COFFEY et al, 1998; AGHI et al, 2008; LAWER et al, 2017).

E por último, muitas células tumorais são deficientes na sinalização mediada por IFN do tipo I (IFN-I), e logo, tornam-se mais propensas à infecção viral (STOJDL et al, 2000; LAWER et. al, 2017). Os IFNs do tipo I são críticos para respostas antivirais e antitumorais em células normais, pois além de promoverem respostas imunes para eliminar o vírus, eles também reduzem a proliferação celular e ativam a proteína pró-apoptótica p53 (TAKAOKA et al, 2003). Vários tipos de tumores bloqueiam esta via, seja reduzindo a expressão de IFN-I, ou limitando a sinalização de IFN tipo I através da redução da expressão do receptor ou da sinalização a jusante alterada. Assim, os vírus oncolíticos aumentaram a especificidade para células tumorais e ambientes nos quais as respostas de IFN-I são limitadas (KAUFMAN, KOHLHAPP e ZLOZA, 2015).

#### **4.2.2.3 ENGENHARIA GENÉTICA E VIROTERAPIA ONCOLÍTICA**

Os vírus oncolíticos são capazes de multiplicar e eliminar, especificamente, as células tumorais, e essas propriedades podem ser intrínsecas ao vírus, ou adquiridas por meio de engenharia genética (LAWER et al, 2017).

Quando a seletividade é inerente ao vírus, a interação é facilitada pelas alterações presentes em células tumorais. Por exemplo, o vírus da doença de Newcastle (NDV) tem como alvo células cancerígenas que superexpressam uma proteína antiapoptótica denominada BCL-XL. Essa seletividade garante a infecção de células capazes de resistir ao período de incubação necessário para que o vírus se multiplique e forme o sincício fundamental para a disseminação viral (MANSOUR, PALESE e ZAMARIN, 2011).

A alteração do genoma viral tem sido uma estratégia relevante para aumentar o tropismo dos vírus oncolíticos (CHOI et al, 2016). Nesse aspecto e considerando o contexto da engenharia genética, o desenho geral das estratégias de vírus oncolíticos deve considerar abordagens para o direcionamento de células tumorais e atenuação da patogênese viral, além de abordagens para limitar a imunogenicidade viral, promovendo a morte e imunogenicidade de células neoplásicas (KAUFMAN, KOHLHAPP e ZLOZA, 2015).

Quando se projetam estratégias para aumentar a seletividade tumoral, existem dois pontos gerais de intervenção: (1) alvejamento da seletividade do vírus antes de penetrar na célula cancerígena (direcionamento transdutivo); e (2) controle da seletividade de multiplicação uma vez que o vírus tenha infectado uma célula (inativação do gene viral, direcionamento da transcrição, sequências de direcionamento de microRNA) (CHOI et al, 2016).

A restrição da penetração viral e infecção através do direcionamento transducional foi realizada a partir de vários métodos, como: a utilização de moléculas adaptadoras para facilitar a adsorção do vírus a uma célula-alvo; pseudotipagem com uma proteína de ligação diferente daquela responsável por causar virulência e engenharia genética de expressão viral ligando alvos dirigidos a células tumorais específicas (CHEN e SZALAY, 2011; CHOI et al, 2016).

Um tipo de estratégia que exemplifica o direcionamento transducional refere-se aos marcadores de superfície, que permitem a síntese de vírus oncolíticos projetados para atingir diretamente receptores únicos da superfície celular expressos em células cancerígenas. Por exemplo, o adenovírus Ad5/3- $\Delta$ 24 foi modificado para se ligar a integrinas superexpressas em células de câncer de ovário, e está atualmente sendo investigado em ensaios clínicos (LIAPSIS et al, 1997; YOU et al, 2001; KAUFMAN, KOHLHAPP e ZLOZA, 2015).

Outro exemplo de especificidade projetada inclui lentivírus pseudotipados com a glicoproteína E2 modificada do vírus Sindbi, que demonstrou aumentar a especificidade para o melanoma humano em um modelo de xenoenxerto de camundongos (MORIZONO et al, 2005). Além disso, o vírus do sarampo foi modificado para expressar um anticorpo de cadeia única que reconhece o antígeno carcinoembrionário (CEA), um antígeno tumoral que é expresso seletivamente em determinados tipos de adenocarcinomas (HAMMOND et al, 2001; KAUFMAN, KOHLHAPP e ZLOZA, 2015).

Várias são as metodologias empregadas para controlar, seletivamente, a multiplicação viral em células cancerígenas. A inativação de genes virais é uma estratégia frequentemente utilizada com essa finalidade; muitas vezes capitalizando as alterações no metabolismo celular e nas vias de sobrevivência nas células transformadas (CHOI et al, 2016).

A deleção do gene que codifica a timidina quinase (tk), no vírus vaccínia (VACV) e no alphaherpesvírus humano 1 gera uma dependência viral pela atividade de tk da célula hospedeira, que é mais elevada nas células tumorais (HENGSTSCHLAGER et al, 1994). Amostras de VACV e alphaherpesvírus humano 1 tk-deletadas demonstraram uma patogenicidade menor, enquanto preservaram um potente efeito anticâncer *in vivo* (BULLER et al, 1985; MARTUZA et al, 1991; JIA et al, 1994; YU et al, 2009).

O direcionamento transcricional, por sua vez, consiste no uso de determinados promotores no controle da expressão de genes virais essenciais. Por exemplo, a síntese da proteína E1A capaz de inibir o ciclo celular durante a infecção pelo CV706, um adenovírus, foi colocada sob o controle do promotor para o antígeno prostático específico (PSA) (DeWEESE et al, 2001). Como resultado, este vírus não produz E1A em células saudáveis e estas células sofrem apoptose, restringindo assim a proliferação viral no tecido saudável. No entanto, em células de câncer de próstata, o promotor de PSA é altamente ativo e E1A é expresso seletivamente, resultando na multiplicação do adenovírus e lise celular mediada pelo vírus (KAUFMAN, KOHLHAPP e ZLOZA, 2015; CHOI et al, 2016).

Após a penetração do vírus na célula hospedeira, outra abordagem para potencializar a especificidade pelo tumor tem sido codificar sequências de miRNA sintéticos (miRTS) na região não traduzida 3' (UTR) do gene de fusão do vírus do sarampo. Essas sequências ligam os microRNAs celulares (miRNAs) e reprimem a multiplicação viral. Como os elementos de miRNA cognatos apresentam uma expressão diferencial em células normais (alta expressão) e

cancerosas (baixa expressão), o vírus oncolítico modificado com miRTS pode ser impedido de se multiplicar em células normais onde miRNAs específicos são expressos (LEBER et al, 2011; KAUFMAN, KOHLHAPP e ZLOZA, 2015).

Um exemplo é o miRNA let-7A, um miRNA supressor de tumor que é expresso em baixos níveis nas células cancerígenas, mas em altos níveis nas células saudáveis. Foi demonstrado que um vírus da estomatite vesicular (VSV) geneticamente modificado contendo três cópias da sequência alvo de miRNA let-7A na 3'UTR do gene viral essencial M, tem como alvo as células tumorais *in vivo*, enquanto reduz a infecção patológica de células normais (EDGE et al, 2008).

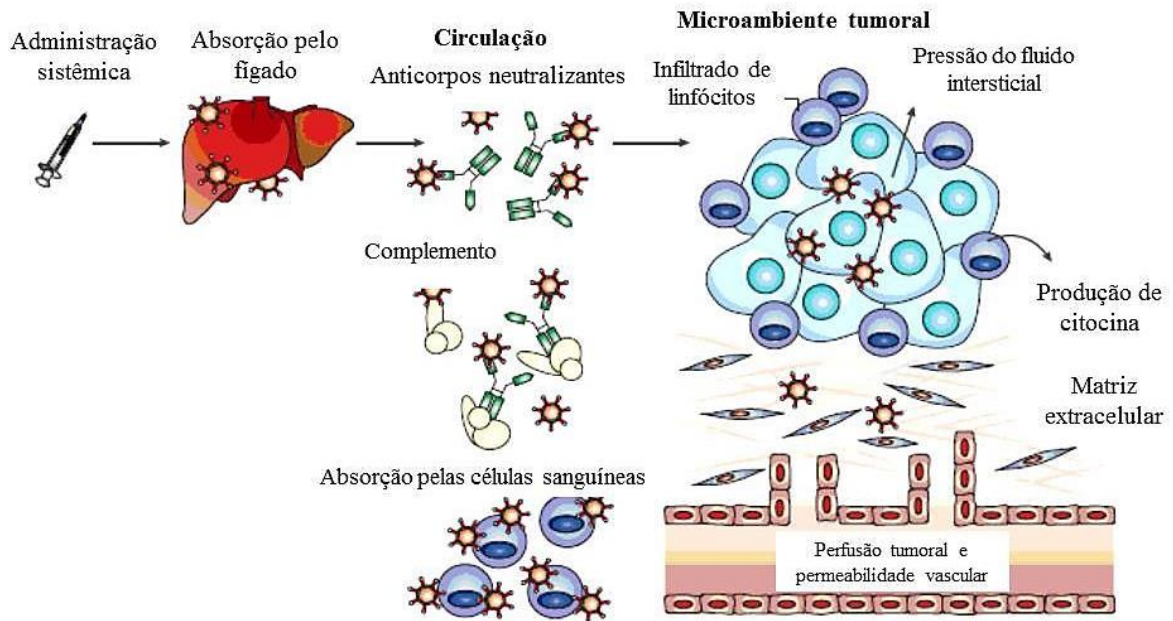
Além das estratégias apresentadas, vários outros mecanismos têm sido explorados para potencializar não somente a seletividade tumoral, mas a atividade oncolítica como um todo. A inclusão de “genes suicidas” (genes que tornam as células mais sensíveis a apoptose ou terapia com outras drogas) em vírus oncolíticos, por exemplo, pode aumentar sua capacidade de eliminar diretamente as células tumorais (FREYTAGE et al, 1998; FREYTAGE et al, 2002; FOLOPPE et al, 2008).

Nesse contexto, moléculas ligantes pró-apoptóticas relacionados ao TNF (TRAIL) ou TNF-  $\alpha$  foram incluídas em construções virais para aumentar a morte celular e desencadear uma resposta imune (SOVA et al, 2004; HIRVINEN et al, 2015). Dois outros “genes suicidas” foram testados: a citosina desaminase bacteriana (CD) capaz de transformar 5-fluorocitosina em 5-fluorouracil (5-FU), que é citotóxico; e a proteína de morte por adenovírus (ADP), uma glicoproteína de membrana nuclear que é necessária para lise celular eficiente e liberação de partículas virais (FREYTAG et al, 2003; DORONIN et al, 2000). A atividade lítica aumentada foi relatada para uma adenovírus oncolítico que teve o gene que codifica ADP inserido no locus adenoviral E3 (DORONIN et al, 2000; KAUFMAN, KOHLHAPP e ZLOZA, 2015).

#### **4.2.2.4 BIODISTRIBUIÇÃO DOS VÍRUS ONCOLÍTICOS**

Naturalmente, os vírus apresentam maiores proporções do que outros agentes antitumorais, como os químicos e anticorpos, por exemplo. Após a administração sistêmica, a maior parte do inóculo viral inicial poderá ser absorvida pelo fígado: os vírus que alcançarem a circulação podem ser rapidamente neutralizados pelo sistema imune do hospedeiro, através

do sistema do complemento ou por anticorpos neutralizantes. Para que o vírus tenha acesso ao tumor, ele deve migrar através da circulação e atravessar o endotélio vascular contra o gradiente de pressão do fluido intersticial. Além disso, a presença de infiltrados de linfócitos pode limitar a propagação viral através da liberação de mediadores inflamatórios e citocinas (Figura 14) (FARIA, 2010).



**Figura 14: Barreiras dos vírus oncolíticos ao tumor.** Quando o inóculo é administrado pela via sistêmica, ele pode ser neutralizado pelo fígado, células sanguíneas, pelo sistema do complemento, ou por anticorpos neutralizantes. Para alcançar o tumor, o vírus precisa passar através do endotélio vascular e por linfócitos que tendem a limitar a sua propagação, por meio da liberação de mediadores inflamatórios e citocinas (Adaptada de FARIA, 2010).

Dessa forma, a maioria dos estudos clínicos com vírus oncolíticos (como adenovírus, poxvírus, alphaherpesvírus humano 1, sarampo e reovírus) utilizaram injeções intratumorais para contornar as barreiras sistêmicas do tumor. No entanto, as injeções intratumorais são limitadas a tumores que são fisicamente acessíveis através da palpação clínica ou imagem direta (KAUFMAN, KOHLHAPP e ZLOZA, 2015).

Após a injeção intratumoral, os vírus também podem encontrar barreiras físicas que dificultam o acesso às células (FARIA, 2010). Os tumores são densos, possuem matriz extracelular e são pouco vascularizados (KAUFMAN, KOHLHAPP e ZLOZA, 2015). Além disso, a presença de necrose, calcificação, hipóxia, acidose, aumento da atividade proteolítica e alta pressão intersticial podem reduzir a disseminação viral (SHEN e HERMISTON, 2005; MOK, BOUCHER e JAIN, 2007; NGUYEN, HO e WAN, 2014).



O tamanho do tumor e heterogeneidade pode representar outra barreira para a biodistribuição do vírus (KAUFMAN, KOHLHAPP e ZLOZA, 2015). Vale ressaltar que, a barreira hematoencefálica também pode limitar a capacidade alguns vírus (e muitas outras drogas) de atingir células de tumores cerebrais primários e metástases cerebrais. Além disso, as células cancerígenas com crescimento aumentado em ambientes hipóxicos são menos propensas a serem permissivas à infecção (HEISE et al, 2000; FUEYO et al, 2000; SHEN e HERMISTON, 2005).

Células estromais, como fibroblastos associados a tumor, podem ser infectadas por vírus oncolíticos, mas não são permissivas à multiplicação viral. Assim, os fibroblastos podem atuar como um reservatório para vírus oncolíticos, reduzindo a liberação de vírions infecciosos para células neoplásicas (LOPEZ et al, 2009). Ainda, outro mecanismo que pode limitar a eficácia geral dos vírus oncolíticos é a suscetibilidade das células cancerígenas a apoptose, que pode ser induzida por infecção viral ou por outros fatores (ZAMARIN e PALESE, 2012).

De forma a contornar os desafios inerentes à biodisponibilidade dos vírus oncolíticos, muitos estudos foram propostos. Por exemplo, a penetração viral pode ser aumentada pelo pré-tratamento do microambiente tumoral com enzimas proteolíticas (isto é, hialuronidase ou colagenase) que podem romper a barreira semelhante a uma peneira colocada pela matriz extracelular (ECM) (McKEE et al, 2006; GANESH et al, 2008). Os vírus oncolíticos também foram projetados para expressar enzimas que degradam ECM, como metaloproteinases de matriz (MMP) e hialuronidase, que mostrou aumentar a disseminação viral no tumor e a atividade terapêutica em um modelo de xenoinxerto de melanoma (GUEDAN et al, 2010) (SCHAFER et al, 2012; MARTINEZ-QUINTANILHA et al, 2015; RODRIGUEZ-GARCIA et al, 2015).

Os vírus oncolíticos também estão sendo selecionadas e/ou manipulados para superar as barreiras físicas da pressão intersticial resultante de fibrose, já que isso diminui a penetração do vírus e pode ser responsável pela evasão viral no local da injeção ou drenagem pela circulação; e, vencer o ambiente ácido e hipóxico (reduz a multiplicação viral e altera a expressão de receptores de superfície) presente nos tumores, espalhando-se entre as células cancerosas após a indução da fusão celular. Este processo protege o vírus das limitações físicas associadas à necessidade de propagação extracelular e limita a infecção ao espaço intracelular (WONG, 2010; CHOI et al, 2016).

Por exemplo, NDV, coronavírus, ortomixovírus e paramixovírus usam glicoproteínas de membrana fusogênica (FMGs) para propagar a infecção viral entre as células. Além disso, o vírus da EV foi modificado para expressar a glicoproteína F mutante fusogênica do NDV (EBERT et al, 2004) e o vírus Sindbis foi modificado para expressar a glicoproteína de envelope hiperfusogênica do vírus da leucemia do macaco gibão favorecendo a propagação viral baseada na atividade fusogênica (ZHANG, FROLOV e RUSSELL, 2004; ZHU et al, 2014).

Para refinar a entrega do vírus no microambiente tumoral, o tratamento com vírus oncolíticos também foi combinado com tratamentos vasoativos ou vaso-normalizantes, como histamina, nitroglicerina, hipertermia local, paclitaxel de baixa dosagem, bevacizumabe e bradicinina (BILBÃO et al, 2000; EISENBERG et al, 2010; INGEMARSDOTTER et al, 2010; DEGUCHI et al, 2012).

#### **4.2.2.5 LIMITAÇÃO DAS RESPOSTAS IMUNES ANTIVIRAIS**

Embora a estimulação imune seja crítica para a atividade antitumoral dos vírus oncolíticos, este efeito é balanceado pela eliminação potencialmente rápida do vírus pela imunidade antiviral (RUSSELL, PENG e BELL, 2014; KAUFMAN, KOHLHAPP e ZLOZA, 2015; CHOI et al 2016).

Vírus administrados por via intravenosa podem ser rapidamente eliminados da circulação como resultado do sequestro pelo sistema fagocitário mononuclear (MPS) no fígado e no baço. Estratégias para minimizar o sequestro incluem modificação química das proteínas de revestimento dos vírus por conjugação de polímeros biocompatíveis, como polietilenoglicol (PEG) e N-[2 hidroxipropil] metacrilamida (HPMA) (ETO et al, 2008; FISHER e SEYMOUR, 2010).

Estudos envolvendo a PEGuilação (conjugação covalente com polietilenoglicol) do capsídeo do vírus da VSV e do adenovírus foram conduzidos para evitar a ligação e neutralização do vírus por anticorpos (O'RIORDAN et al, 1999; MORRISON et al, 2008; TESFAY et al, 2013; KAUFMAN, KOHLHAPP e ZLOZA, 2015; GOPISANKAR e SURENDIRAN, 2018). A PEGuilação das glicoproteínas em vetores do vírus da VSV, por exemplo, aumentou o tempo de circulação do vetor, assim como inibiu de maneira significativa a inativação do complemento (CROYLE et al, 2004).

Muitas das barreiras encontradas pelos vírus após administração intravenosa, como por exemplo, anticorpos neutralizantes, inativação por complemento ou eliminação por células de Kupffer, podem ser superadas pela ocultação de vírus oncolíticos dentro de células transportadoras. É importante ressaltar que os portadores celulares devem idealmente ser combinados com vírus oncolíticos que não eliminarão a célula portadora antes que o vírus se infiltre no tumor (RUSSELL, PENG e BELL, 2014).

As células-tronco mesenquimais (MSCs) são um tipo de célula que foram utilizadas para fornecer vírus oncolíticos a células tumorais. Foi demonstrado uma preferência das MSCs por tumores sólidos. Adicionalmente, também foi evidenciado que elas poderiam fornecer eficientemente vírus oncolíticos do sarampo para depósitos intra-peritoneais de câncer ovariano na presença de anticorpos neutralizantes (MADER et al, 2009; DWYER et al, 2010; GARCIA-CASTRO et al, 2010; LING et al, 2010). Células dendríticas e células T quando administradas com reovírus, transportaram e liberaram vírus oncolíticos mesmo diante de anticorpos neutralizantes (ILETT et al, 2009; ILETT et al, 2011).

Outra estratégia para limitar a neutralização dos vírus oncolíticos pelo sistema imune, consiste em utilizar sorotipos alternativos de vírus. Existem vários sorotipos para ambos os vírus, adenovírus e vírus da EV, o que permite a troca de sorotipo entre injeções para evitar a neutralização do anticorpo. Embora o vírus do sarampo não troque naturalmente os sorotipos, os vírus do sarampo que são projetados para mimetizar a troca de sorotipos têm mostrado limitar os títulos de anticorpos neutralizantes contra o vírus (CATTANEO et al, 2008).

#### **4.2.2.6 VIROTERAPIA COMBINADA**

A quimioterapia e/ou radioterapia são atualmente o tratamento padrão para muitas neoplasias malignas. Contudo, dados clínicos sugerem que a combinação de vírus oncolíticos com essas terapias sistêmicas pode aumentar a resposta observada apenas com a viroterapia (CHOI et al, 2016).

O ensaio clínico para o adenovírus ONYX-015 mostrou uma taxa de resposta de 65% em doentes a receber o vírus mais 5-FU/cisplatina, em comparação com uma taxa de resposta de apenas 14% para o vírus isolado (KHURI et al, 2000). Outras linhas de evidência sugerem que os agentes quimioterápicos também podem melhorar a função dos vírus oncolíticos, o que

afeta a resposta imune à infecção (NGUYEN, HO e WAN, 2014). O paclitaxel, por exemplo, regula positivamente a expressão da molécula do MHC classe I, levando a uma melhor apresentação do antígeno e iniciação cruzada do sistema imune (KANENO et al, 2011). De maneira similar, demonstrou-se que a doxorrubicina regula negativamente a PD-L1, que desempenha um papel na imunossupressão (GHEBEH et al, 2012).

A terapia combinada também mostrou melhorar a resposta antitumoral em modelos pré-clínicos, aumentando a apoptose (ROGULSKI et al, 2000; DAI et al, 2014). O alphaherpesvírus humano 1 intratumoral (G207) tem sido usado com sucesso em ensaios clínicos em combinação com radioterapia em pacientes com glioblastoma multiforme recorrente (GBM), com seis de nove pacientes demonstrando doença estável ou resposta parcial (MARKERT et al, 2014).

Atualmente, há uma tendência de pesquisa focada no efeito da combinação de vírus oncolíticos imunoestimuladores com o bloqueio do ponto de verificação imune nos tumores, o que acelera de maneira efetiva a resposta imune antitumoral e, simultaneamente, remove as barreiras que poderiam prejudicar a morte tumoral mediada por células T. Um exemplo que corrobora essa ideia reside no talimogene laherparepvec, que se encontra em ensaio clínico em associação com o ipilimumab. Essa combinação pode potencializar a resposta em tumores imunossensíveis, como o melanoma, e podem tornar os tumores resistentes aos inibidores de ponto de verificação mais sensíveis ao tratamento (LAWER et al, 2017).

A síntese de novos vírus oncolíticos que expressem moléculas de anticorpos inibitórios de ponto de verificação está em desenvolvimento. Isso permitiria a expressão *in situ*, o que evitaria efeitos sistêmicos adversos decorrentes da entrega do anticorpo e aumentaria a resposta imune local contra as células tumorais (LAWER et. al, 2017).

### **4.3 OS VÍRUS ONCOLÍTICOS COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA NO CÂNCER DE MAMA**

Diversos vírus oncolíticos têm sido identificados como potenciais agentes terapêuticos para o tratamento do câncer de mama em estágios avançados. Um exemplo muito bem sucedido, é o alphaherpesvírus humano 1 oncolítico T-VEC, que foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para uso clínico (O'BRYAN e MATHIS, 2018).

#### **4.3.1 ESPÉCIES DE VÍRUS ONCOLÍTICOS PARA O CÂNCER DE MAMA**

Na pesquisa do câncer de mama, vários vírus já foram extensivamente testados pré-clinicamente para avaliar a sua eficácia oncolítica. Dos sete grupos do sistema de classificação proposto por Baltimore, os vírus do grupo I (vírus de DNA de fita dupla - DNAds), grupo III (vírus de RNA fita dupla), grupo IV (vírus de RNA fita simples – sentido positivo) e grupo V (vírus de RNA fita simples – sentido negativo), têm sido exaustivamente pesquisados como candidatos potenciais para a terapia do câncer de mama, com base em seu uso anterior como vacinas ou facilidade de manipulação e engenharia genética (O'BRYAN e MATHIS, 2018).

Os vírus do grupo I que têm sido explorados para a terapia do câncer de mama, incluem os adenovírus oncolíticos (Ado), alphaherpesvírus humano 1 e vaccínia vírus (VACV). Os vírus representantes desse grupo, com exceção do VACV, requerem replicação do DNA dentro do núcleo da célula hospedeira, sem, entretanto, se integrarem ao genoma do hospedeiro. Cada vírus utilizado para terapia oncolítica tem seus padrões únicos de penetração e multiplicação celular, que podem ser refinados para fornecer transgenes no núcleo da célula hospedeira (O'BRYAN e MATHIS, 2018).

O grupo III é composto por vírus que apresentam um amplo espectro de hospedeiros, incluindo bactérias, fungos, animais e plantas. A grande maioria desses vírus possui estruturas de capsídeo icosaédricas e contém genoma de RNA segmentado (entre 1-12 moléculas), cada segmento, codificando uma ou mais proteínas virais. Após a infecção, o RNAds genômico é transcrito em mRNAs que servirão para tradução e replicação (O'BRYAN e MATHIS, 2018).

Os vírus representantes do grupo IV utilizam diretamente o RNAss como mRNA mensageiro para o processo de tradução no citoplasma. Aqueles explorados para uso no

tratamento do câncer de mama são os picornavírus, do gênero *Enterovirus*, também conhecidos como vírus entéricos. Entretanto, o coxsackievirus e o poliovirus também têm sido explorados na pesquisa do câncer de mama (O'BRYAN e MATHIS, 2018).

Pesquisas adicionais sobre o câncer de mama, também foram conduzidas com os vírus do grupo V. Esse grupo engloba vírus que têm sido utilizados para tratar diversos tipos de cânceres. Contudo a aplicação no câncer de mama, ainda é incipiente e inclui: o vírus da VSV, vírus do sarampo, o vírus Maraba e o NDV (O'BRYAN e MATHIS, 2018).

#### 4.3.2 MECANISMOS DE AÇÃO

Algumas evidências têm sugerido de que a recorrência do tumor de mama poderia ter origem em uma pequena população de células com propriedades de células-tronco: as chamadas, células-tronco de câncer (CSCs), ou células iniciadoras do câncer (VELASCO-VELÁZQUEZ et al, 2012). Estas células são comuns em vários tipos de tumores e têm a capacidade de diferenciação, auto renovação e multilinhagem; desempenhando assim, um papel central na recorrência do câncer, de metástases e resistência a terapias convencionais (NGUYEN et al, 2010).

Desse modo, é crucial o controle das CSCs para impedir a recorrência do câncer de mama e garantir, o sucesso do tratamento (TOSONI et al, 2017). A viroterapia oncolítica surge como uma nova estratégia para controlar as CSCs, demonstrando eficácia no tratamento do câncer de mama em vários estudos pré-clínicos e clínicos (CODY e HURST, 2015; EBRAHIMI et al, 2018).

As CSCs podem ser reconhecidas e isoladas com base na expressão de marcadores de superfície celular específicos, dentre eles, CD44, CD24, CD133 e enzimas de metabolização de drogas, incluindo a aldeído desidrogenase 1 (ALDH1) (PONTI et al, 2006). Nesse contexto, vários estudos foram realizados confirmando a eficácia da viroterapia oncolítica para a seletividade de CSCs (EBRAHIMI et al, 2018).

Eriksson et al (2007) extraíram células CD24 (-) e CD44 (+) do líquido pleural relacionado ao câncer de mama. Eles demonstraram que adenovírus oncolíticos com capsídeo mutado Ad5/3-Δ24 e Ad5.pk7-Δ24 reduziram a potência tumoral dessas células em modelos *in vitro* e *in vivo*. De modo similar, Marcato et al (2009) mostraram que uma injeção intratumoral de reovírus oncolíticos induziu de maneira eficaz a regressão do câncer e

eliminou CSCs em xenoinxertos de tumores mamários sólidos em modelo murino (EBRAHIMI et al, 2018).

Ainda, Wang et al (2012) demonstraram que as CSCs da mama, que possuem maior atividade da enzima ALDH1, estão mais propensas à infecção por VACV oncolíticos em comparação com células com menor atividade da ALDH1. Esse achado foi associado a uma citotoxicidade aumentada, multiplicação viral eficiente e aumento da lise das CSCs mediada por vírus. Em outro estudo, Li et al (2012) mostraram que o vetor oncolítico alfa herpesvírus humano 1 G47D é altamente citotóxico para as células de linhagem CD44 (+)/CD24(-) primárias de câncer de mama humano. O tratamento com G47D inibiu de modo satisfatório o crescimento tumoral em modelos murinos de câncer de mama. Adicionalmente, eles demonstraram que o G47A elimina eficazmente todos os tipos de células de câncer de mama por meio de multiplicação viral eficiente entre CSCs (EBRAHIMI et al, 2018).

A estratégia de geração de vírus oncolíticos seletivos para células tumorais de mama tem sido exaustivamente explorada, e vários estudos foram realizados com o uso de promotores específicos em vírus oncolíticos contra as células do câncer de mama. Kurihara et al (2000) sintetizaram um adenovírus dirigido ao câncer de mama, Ad. DF3-E1, cujo gene da região precoce do adenovírus 1A (E1A), envolvido na sua multiplicação, é expresso sob o controle do gene promotor DF3/MUC1. Este, por sua vez, é altamente expresso no carcinoma da mama humano. Sendo assim, o Ad.DF3-E1 multiplica-se seletivamente nas células do câncer de mama positivas para MUC1 e também inibe o crescimento de tumores em modelo de xenoinxertos de tumor de mama (KURIHARA et al, 2000; EBRAHIMI et al, 2018).

O Ad.DF3-E1 também foi modificado para expressar o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), uma das principais citocinas pró-inflamatórias com potentes efeitos antitumorais, por meio da incorporação do promotor de citomegalovírus (Ad.DF3-E1/citomegalovírus – TNF). A administração de Ad.DF3-E1/citomegalovírus – TNF demonstrou maior eficácia na indução de regressão tumoral estável em comparação com o Ad.DF3-E1 isoladamente. Adicionalmente, outros estudos demonstraram que outro adenovírus E1A mutante, dl922-947, reduziu as metástases de pulmão e linfonodos em um modelo de xenoinxerto de tumor de mama (HEISE et al, 2000; EBRAHIMI et al, 2018).

A terapia com alvo de microRNA (miRNA) também aumenta a seletividade dos vírus oncolíticos por tumores de mama. Isto porque, as células cancerígenas possuem um perfil distinto de padrão de expressão de miRNA quando comparadas com células normais

(EBRAHIMI et al, 2018). Nesse aspecto, um estudo direcionou com sucesso a multiplicação de um adenovírus quimérico, Ad5-10miR145T, para células de tumor de mama por meio da inserção de 10 cópias do sítio de ligação para microRNA supressor de tumor (miRNA) miR145 a jusante do gene Ad E1A. Esta técnica, relativamente nova, foi desenvolvida visando suprimir a multiplicação viral em ambientes celulares com alto teor de miR145. Devido à diminuição dos níveis de miR145 no câncer, o Ad5-10miR145T foi capaz de se multiplicar nas células do câncer de mama (SHAYESTEHPOUR et al, 2017; O'BRYAN e MATHIS, 2018).

Sagara et al (2016) projetaram um recombinante de coxsachievirus B3 de tipo selvagem (CVB3-W3), no qual sequências alvo de miR-1 e miR-217- foram inseridas. O CVB3-miRT apresentou atividade oncolítica efetiva contra células cancerígenas mamárias triplo-negativo (TNBC). Além disso, observou-se um crescimento tumoral reduzido e um aumento na taxa de sobrevida quando xenoenxertos TNBC subcutâneos foram injetados intratumoralmente com CVB3-W3-miRT. De forma a embasar ainda mais a eficácia da viroterapia oncolítica direcionada mediada por miRNA, Edge et al (2008) demonstraram que a inserção de sequências alvo de miRNA-7 em vírus da estomatite vesicular (EV) oncolítico acarretou na diminuição da toxicidade e aumentou a atividade antitumoral *in vivo*, reforçando a potência terapêutica dos vírus oncolíticos seletivos para o câncer de mama (EBRAHIMI et al, 2018).

Outra estratégia utilizada na viroterapia oncolítica direcionada para o câncer de mama é a eliminação dirigida de células tumorais mamárias que expressam marcadores de superfície celular específicos; incluindo o receptor de tirosina quinase ErbB2 [receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2/ neuregulina (HER2/neu)]. Este receptor é superexpresso em 15 a 30% dos cânceres invasivos de ovário e de mama e está associado à patologia agressiva de ambos os tumores (SAUER et al, 2003; VERRI et al, 2005; NECHAEV et al, 2013).

Vários estudos demonstraram que os vírus oncolíticos geneticamente modificados apresentam seletividade para as células cancerosas que expressam HER-2. Em um estudo para sintetizar um alphaherpesvírus humano 1 oncolítico seletivo para HER2/neu (+), Menotti, Cerretani e Campadelli-fiume (2006) produziram dois recombinantes, R-LM11 e R-LM11L, que transportavam um anticorpo de cadeia única contra HER2. Além disso, sintetizaram um



alphaherpesvírus humano 1 recombinante totalmente redirecionado (R-LM113) capaz de infectar as células e se espalhar célula a célula somente via HER2 (MENOTTI et al, 2008).

Adicionalmente, em outro estudo, a administração intra-tumoral de R-LM249 em camundongos portadores de tumores humanos hiperexpressivos para HER-2, inibiu significativamente o crescimento e a progressão tumoral (MENOTTI et al, 2009). Além disso, R-LM249 demonstrou eficácia contra metástases peritoneais e cerebrais de cânceres de ovário e de mama humanos (NANNI et al, 2013).

Outros receptores também são superexpressos no câncer de mama, por exemplo o ligante de CD40 (CD40L, CD154). Um adenovírus manipulado carregando o CD40L (AdEHCD40L) inibiu significativamente o crescimento de células de câncer de mama humano CD40 (+). Consistentemente com os resultados celulares, a injeção intratumoral de AdEHCD40L, reduziu o crescimento tumoral em um modelo de camundongos xenoenxertados. Esses efeitos protetores foram associados à parada do ciclo celular e aumento da apoptose em células tumorais infectadas com AdEHCD40L (GOMES et al, 2009; EBRAHIMI et al, 2018).

Outra abordagem consiste na inserção de genes terapêuticos no genoma viral. Os ligantes do fator de crescimento transformador (TGF)  $\beta$ 1 são superexpressos em vários tumores, incluindo o câncer de mama e está associado a um fenótipo invasivo (GOLD, 1999; IVANOVIC et al, 2003). Seth et al. (2006) sintetizaram um adenovírus oncolítico (Ad.sT $\beta$ RFc) com inserção do gene para o receptor TGF  $\beta$  solúvel do tipo II (TGF  $\beta$ RII) e região Fc de uma imunoglobulina humana (sTGF $\beta$ RIIFc). Células do câncer de mama humano infectadas com Ad.sT $\beta$ RFc produziram sTGF $\beta$ RII que foi secretado no meio extracelular, e após a interação com TGF-  $\beta$ 1 anulou as respostas de transcrição dependentes de TGF- $\beta$  em células do câncer de mama (SETH et al, 2006; EBRAHIMI et al, 2018).

A inibição e a regressão tumoral também foram observadas em camundongos tratados com Ad.sT $\beta$ RFc. Além disso, o Ad.sT $\beta$ RFc se liga ao TGF- $\beta$  com alta afinidade e é capaz de suprimir as metástases ósseas do câncer de mama (HU et al, 2010).

Um efeito inibitório de metástase de células de câncer de mama também foi demonstrado por Yang et al. (2015) utilizando adenovírus oncolíticos contendo decorina, um supressor de tumor frequentemente regulado de maneira negativa no câncer de mama. Foi detectada uma potente indução de respostas antitumorais capaz de prevenir metástases ósseas

do câncer de mama. Também foi demonstrado que o adenovírus oncolítico contendo decorina diminuiu significativamente as metástases do câncer de mama nos pulmões (YANG et al, 2015; EBRAHIMI et al, 2018).

Genes antiangiogênicos que diminuem o crescimento tumoral em diferentes modelos de câncer de mama, também podem ser inseridos em vírus oncolíticos. Bazan-Peregrino et al. (2013) inseriram genes que codificam dois inibidores da angiogênese: a tirosina quinase-1 solúvel (sFlt-1 ou sVEGFR-1) para antagonizar a atividade do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), e o domínio extracelular Delta-like 4 (sDll4) que antagoniza a sinalização de Notch em um adenovírus oncolítico seletivo de câncer de mama (AdEHE2F-sFlt1 ou AdEHE2F-sDll4). Os resultados mostraram que os efeitos antitumorais e antiangiogênicos sinérgicos do vírus recombinante foram efetivos em inibir o crescimento do tumor e aumentar o tempo de sobrevivência (EBRAHIMI et al, 2018).

Os vírus oncolíticos foram inicialmente explorados como agentes únicos e, posteriormente, em combinação com as terapias existentes (O'BRYAN e MATHIS, 2018). Uma gama de estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a combinação de vírus oncolíticos com terapias convencionais poderia potencializar a eficácia da viroterapia. De maneira a embasar essa hipótese, Cody, Markert e Hurst (2014), mostraram que a administração de inibidores da histona desacetilase aumentou a atividade do alfa herpesvírus humano 1 oncolítico em células tumorais mamárias, pois interrompeu as respostas inatas antivirais (CODY, MARKERT e HURST, 2014).

Do mesmo modo, Fang et al (2013) investigaram a potência da terapia combinada de adenovírus interleucina-24 (ZD55IL- 24) com paclitaxel (PTX), um medicamento quimioterápico, em células do câncer de mama. Esse estudo demonstrou que a co-administração de ZD55 IL-24 com PTX elevou de maneira significativa o efeito citotóxico e indutor de apoptose, já que aumentou os níveis de proteínas proapoptóticas, ativando caspase -3, -7, e -9 e regulando negativamente as proteínas antiapoptóticas (FANG et al, 2013).

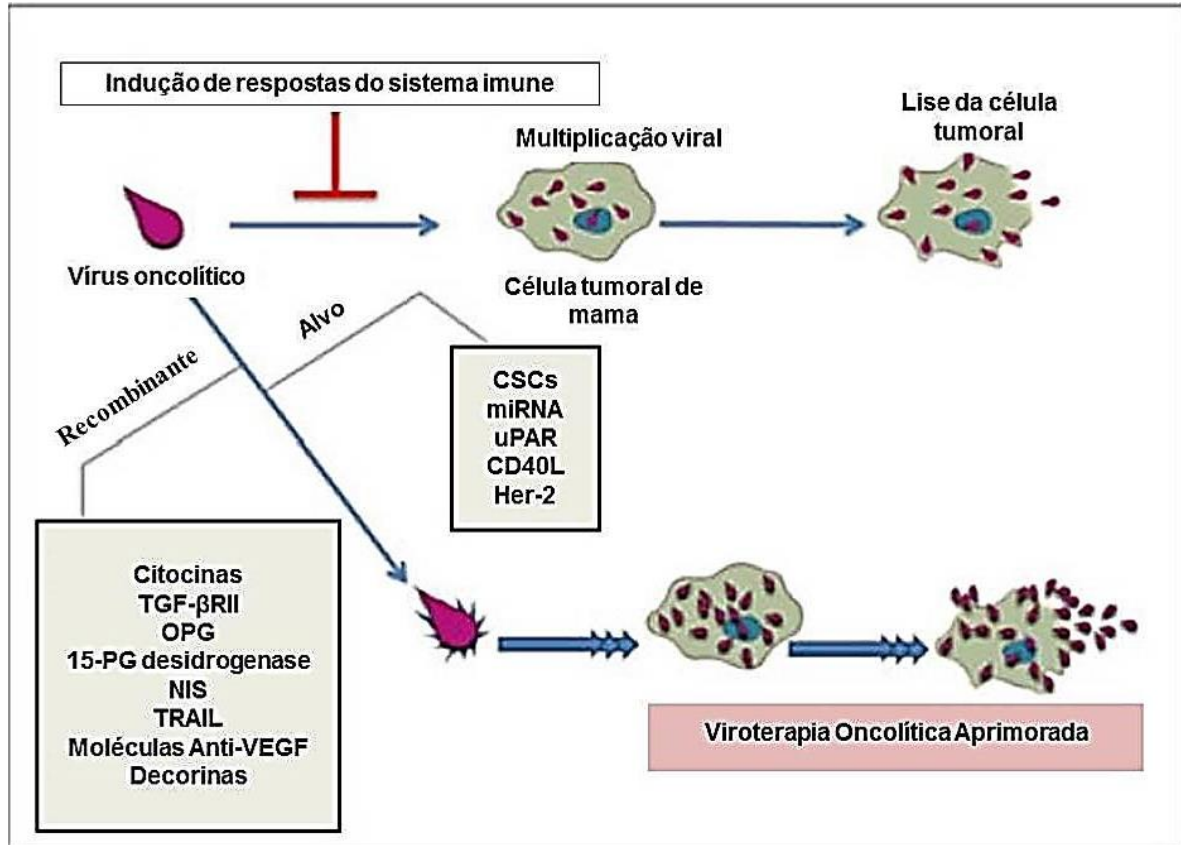
Adicionalmente, a terapia combinada do vetor de alfa herpesvírus humano 1 oncolítico (G47 $\Delta$ ) com PTX potencializou o tratamento do câncer de mama, pois aumentou a parada mitótica induzida por PTX e apoptose em linhagens de células de câncer de mama. De maneira consistente, o tratamento combinado em modelos de câncer de mama murino (EMT6, 4T1 e E0771) com PTX e Rhabdovirus oncolítico – GM1 melhorou a eficácia dos modelos de

câncer de mama e mostrou atividade citopática sinérgica (BOURGEOIS-DAIGNEAULT et al, 2016).

Para comprovar a eficácia terapêutica combinação entre vírus oncolíticos e terapias convencionais, Bramante et al (2016) demonstraram que a co-administração de adenovírus oncolítico Ad5/3-D24-GMCSF com baixa ciclofosfamida, uma droga antineoplásica, potencializou a inibição do crescimento tumoral em xenoenxertos TNBC. Similarmente, a terapia combinada de doxorrubicina, uma droga quimioterápica, com um vírus oncolítico Human alphaherpesvirus tipo 2 melhorou os efeitos antitumorais do vírus em comparação com qualquer tratamento isolado em modelo murino apresentando câncer de mama 4T1 (EBRAHIMI et al, 2018).

No contexto da terapia combinada, o tratamento oncolítico associado à quimioterapia pode aumentar a toxicidade nas CSCs mamárias. Assim, Zhuang et al (2012) demonstraram que a administração combinada de alphaherpesvírus humano 1 oncolítico com doxorrubicina, um fármaco quimioterápico, aumentou a sensibilidade das CSCs resistentes a drogas e reforçou sinérgicamente, as respostas antitumorais também no modelo *in vivo* (ZHUANG et al, 2012).

Adicionalmente, Zeng et al (2013) mostraram que o tratamento com o vetor de alphaherpesvírus humano 1 oncolítico de terceira geração, G47 $\Delta$  eliminou de maneira efetiva, *in vitro*, distintos subtipos celulares do câncer de mama atuando contra células CSCs e não-CSCs, que mostraram resistência ao PTX. Além disso, o G47 $\Delta$  induziu a regressão de xenoenxertos tumorais em camundongos BALB/c e trabalhou sinérgicamente com PTX eliminando ambos os tipos celulares (EBRAHIMI et al, 2018). Os mecanismos antitumorais dos vírus oncolíticos no câncer de mama estão sumarizados na figura 15 (EBRAHIMI et al, 2018).



**Figura 15. Representação esquemática dos mecanismos antitumorais de vírus oncolíticos no câncer de mama.** Os vírus oncolíticos possuem, naturalmente, um duplo mecanismo de ação: morte seletiva de células tumorais, eliminando diretamente as células cancerígenas através da multiplicação viral; ou, por indução de imunidade antitumoral sistêmica. A eficácia da viroterapia oncolítica pode ser refinada para tratar diferentes tipos de tumores; dentre eles, o câncer de mama. Sendo assim, vetores oncolíticos podem ser sintetizados para melhorar a afinidade por células de mama tumorais, e sua posterior eliminação. Nesse sentido várias estratégias têm sido propostas: aumento da seletividade por célula-tronco de câncer (CSCs); inserção de promotores no vírus que atuem na expressão de citocinas pró-inflamatórias com potentes efeitos antitumorais, como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); eliminação dirigida de células tumorais mamárias que expressam marcadores de superfície celular específicos, como o receptor do fator de crescimento epidérmico 2, ERBB2 (antigo HER2/neu), receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 ou CD40L; inserção de genes de microRNA supressor de tumor miRNA, microRNA; inserção de genes terapêuticos no genoma viral TGF -  $\beta$ , fator de crescimento transformador -  $\beta$ ; TRAIL, ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral; inserção de genes antiangiogênicos, anti-VEGF (fator de crescimento endotelial vascular); e outras estratégias que aumentam a eficácia dos vírus oncolíticos utilizados no tratamento do câncer de mama (Adaptado de EBRAHIMI et al, 2018).

## 4.4 HERPESVIRUS

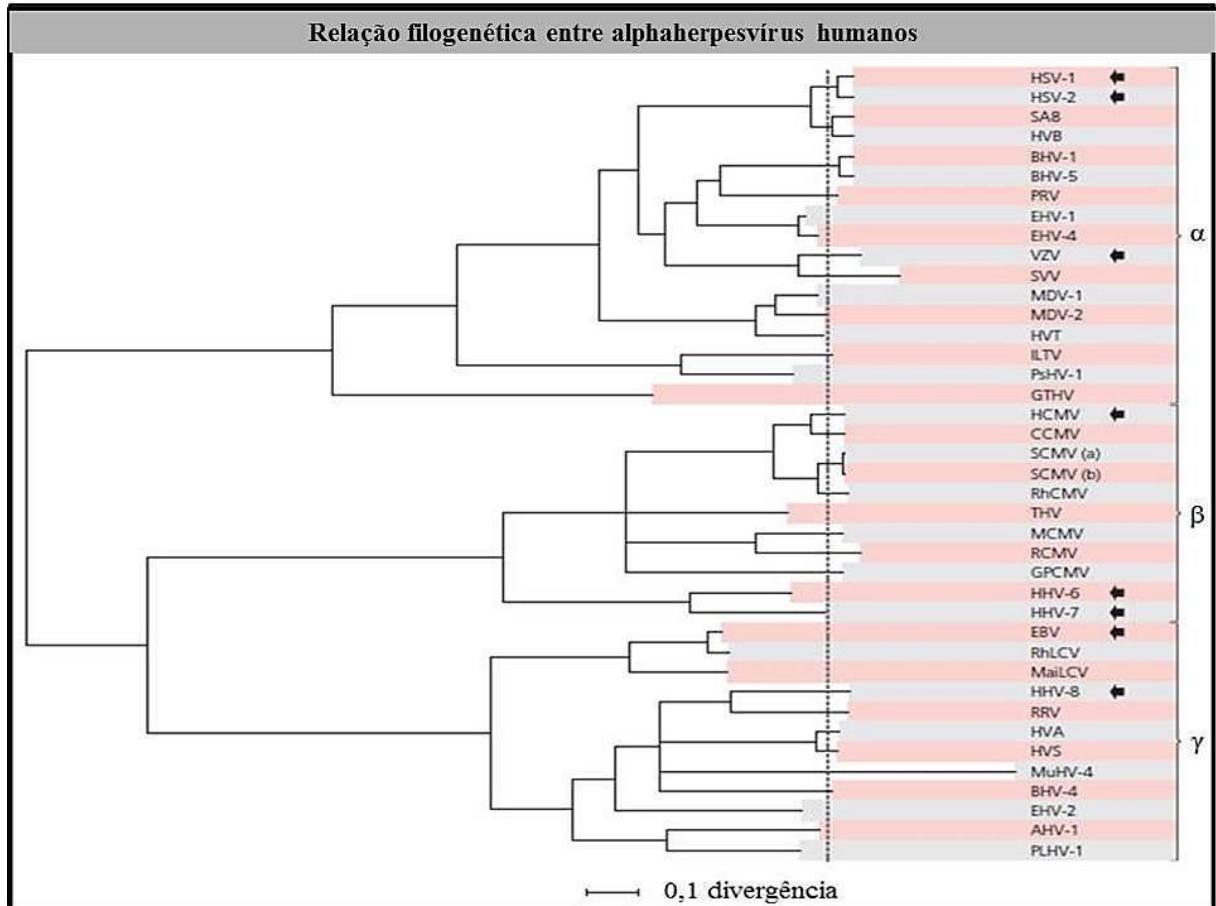
### 4.4.1 ASPECTOS TAXONÔMICOS

Herpes é derivado da palavra grega *herpein*, que significa “rastejar”, e descreve a natureza rastejante ou disseminadora das lesões cutâneas frequentemente associadas à infecção por herpes (KAUFMAN et al., 2013).

O alphaherpesvírus humano 1 pertence à ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e gênero *Simplexvirus* (CRIMI et al., 2019).

A ordem *Herpesvirales* compreende três famílias: *Herpesviridae*, *Alloherpesviridae* e *Malacoherpesviridae* (LOUTEN, 2016; BURRELL, HOWARD e MURPHY, 2017; SMITH e WHITLEY, 2017; ICTV, 2018). A família *Alloherpesviridae* reúne vírus que infectam anfíbios e peixes, enquanto que *Malacoherpesviridae* abrange vírus que possuem moluscos como hospedeiros (LOUTEN, 2016).

A família que contém o herpesvírus humano, *Herpesviridae*, inclui vírus que infectam répteis, aves e mamíferos; incluindo os humanos (LOUTEN, 2016; ICTV, 2018). Ela é subdividida em três subfamílias, *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae*; baseada na gama de hospedeiros, organização genética e estratégias de replicação de cada subfamília (Figura 16) (SEHRAWAT; KUMAR; ROUSE, 2018; ICTV, 2018).



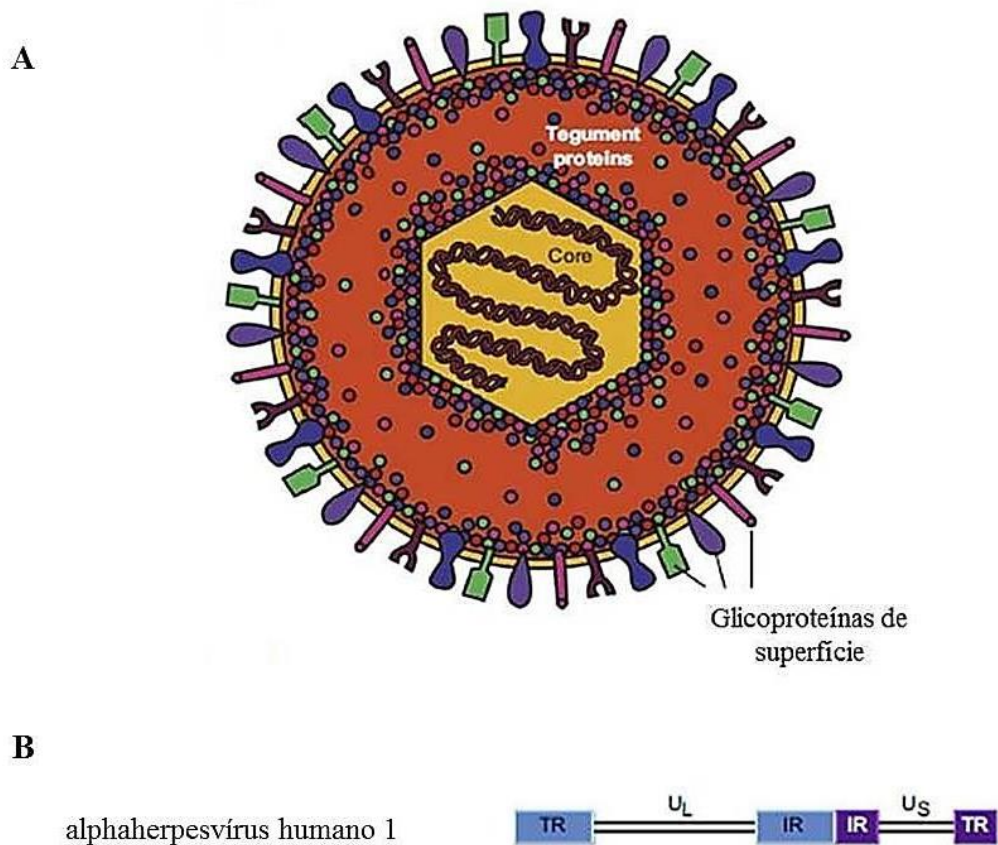
**Figura 16. Relação filogenética entre os alphaherpesvírus humanos.** A árvore foi sintetizada com base no alinhamento de sequências de aminoácidos para seis genes do alphaherpesvírus humano 1: UL15, UL19, UL27, UL28, UL29 e UL30 (Adaptado de SMITH e WHITLEY, 2017).

As subfamílias, por sua vez, são divididas em gêneros baseados principalmente na reatividade cruzada antigênica, tamanho do genoma e estrutura (BURRELL, HOWARD e MURPHY, 2017). O alphaherpesvírus humano 1 e 2 e o vírus varicela zoster (VZV) são vírus  $\alpha$ -herpes. Esses vírus, geralmente, infectam células epiteliais *in vivo*, causam lesões vesiculares e estabelecem latência nos neurônios. Os vírus  $\beta$ -herpes incluem o citomegalovírus (CMV) e o herpesvírus humano (HHV) 6 e 7. Esses vírus têm um ciclo de multiplicação lento, estabelecem latência em monócitos, linfócitos T ou células progenitoras da medula óssea, e geralmente causam infecção subclínica. Já os vírus Epstein Barr (EBV) e o herpesvírus humano 8 (HHV-8) pertencem à subfamília *Gammaherpesvirinae*. Ambos os vírus infectam produtivamente e tornam-se latentes nos linfócitos ou tecidos linfoides. Além disso, podem induzir a transformação de células infectadas, levando ao câncer (LOUTEN, 2016; SEHRAWAT; KUMAR; ROUSE, 2018).

#### 4.4.2 BIOLOGIA VIRAL

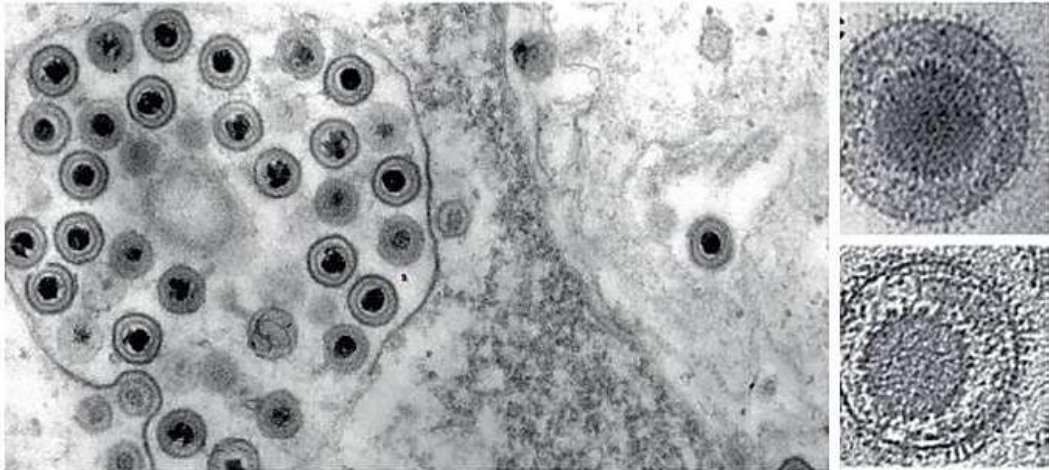
O alphaherpesvírus humano 1 é um vírus de DNA de fita dupla envelopado (dsDNA); com um tamanho de genoma de aproximadamente 152 kb (SHEN e NEMUNAITIS, 2006; KAUFMAN et al., 2013; LOUTEN, 2016; BURRELL, HOWARD e MURPHY, 2017; SMITH e WHITLEY, 2017; RYU, 2017; CRIMI et al., 2019).

O vírion do herpesvírus compreende quatro camadas concêntricas: um núcleo interno, envolto por um capsídeo icosaédrico, seguido por um tegumento amorfo e um envelope. O genoma do DNA é enrolado e está associado a um núcleo de proteína. O capsídeo é um icosaedro montado no núcleo, com 100 nm de diâmetro e composto por quatro proteínas principais e várias proteínas menores. Ao redor do capsídeo está uma massa amorfa de 15 a 40 proteínas distintas, denominada de tegumento (Figuras 17 e 18) (SHEN e NEMUNAITIS, 2006; LOUTEN, 2016; BURRELL, HOWARD e MURPHY, 2017).



**Figura 17. Estrutura do alphaherpesvírus humano 1.** (A) Os alphaherpesvirus humanos 1 são vírus icosaédricos envelopados com núcleos de genoma de dsDNA cercados por duas camadas de proteínas tegumentares, uma camada interna localizada ao redor do capsídeo e uma camada externa diretamente abaixo do envelope. O envelope viral contém várias glicoproteínas que se projetam da superfície. (B) As regiões codificadoras de genes dos genomas do herpesvírus são conhecidas como regiões “únicas longas” (UL) e “únicas curtas” (US), referindo-se ao comprimento do DNA entre as seqüências repetidas terminais ou internas do DNA, conhecidas como regiões TR e IR, respectivamente (Adaptado de LOUTEN, 2016).





**Figura 18. Microscopia eletrônica e microscopia crio-eletrônica do alphaherpesvírus humano 1.** À esquerda, microscopia eletrônica de seção delgada do alphaherpesvírus humano 1 mostrando virions envolvidos em vários estágios de maturação em uma invaginação citoplasmática no núcleo de uma célula infectada em cultura. Vários capsídeos estão prestes a brotar através da lamela externa do envelope nuclear. À direita, microscopia crio-eletrônica dos capsídeos do alphaherpesvírus humano 1, mostrando as projeções de nucleocapsídeo, tegumento, envelope e superfície (peplômeros) (Adaptado de BURRELL, HOWARD e MURPHY, 2017).

As proteínas do tegumento são geralmente encontradas em duas camadas: uma camada associada ao capsídeo interno e uma camada associada ao envelope externo. Elas representam 40% da massa da partícula (LOUTEN, 2016). É importante ressaltar que as proteínas do tegumento são essenciais para o estabelecimento da infecção pelo vírus (SMITH e WHITLEY, 2017). Entre mais de 15 proteínas tegumentais virais identificadas, três delas estão bem caracterizadas: proteína VP16, ICP0 e Vhs. VP16 é uma proteína de tegumento que atua como um transativador de transcrição dos genes virais (isto é, genes precoces imediatos). A ICP0, a ubiquitina E3 ligase viral, tem como alvo um número de proteínas celulares que restringem a infecção viral pela degradação. Por sua vez, a proteína Vhs neutraliza a resposta imune inata, reduzindo a estabilidade do mRNA, em particular a dos interferons e citocinas pró-inflamatórias (RYU, 2017).

O envelope lipoprotéico que delimita o tegumento contém numerosos pequenos peplômeros de glicoproteínas incorporados. Relações antigênicas são complexas. Existem alguns antígenos compartilhados dentro da família, mas espécies diferentes têm glicoproteínas de envelope distintas. A partícula completa do herpesvírus possui aproximadamente 220 nm (LOUTEN, 2016; BURRELL, HOWARD e MURPHY, 2017).

Como mencionado anteriormente, cada herpesvírus possui um núcleo linear de dsDNA que codifica a informação genética do vírus com um tamanho de aproximadamente 152 kb. O número de genes traduzíveis (quadros de leitura abertos ou ORFs) é proporcional ao tamanho do genoma. As regiões codificadoras de genes dos genomas do herpesvírus são denominadas regiões “único longo” (UL) ou “único curto” (US). Existem sequências nucleotídicas repetidas no genoma do herpesvírus, seja terminal (no final do genoma) ou interno, e essas podem ser repetições diretas ou invertidas. Nessas sequências repetidas são encontrados promotores de genes UL ou US, origens de replicação do DNA, alguns genes codificadores de proteínas e DNA que codifica transcritos associados à latência (LATs) (SHEN e NEMUNAITIS, 2006; LOUTEN, 2016; RYU, 2017).

A maioria dos genes de herpesvírus possui um promotor individual contendo sequências reguladoras e uma caixa TATA, um local de iniciação da transcrição e uma sequência de sinal de poliadenilação. Ao contrário dos eucariotos, é comum que os vírus do herpes possuam múltiplos genes em uma seção do DNA (DNA policistrônico) e frequentemente terminam na mesma sequência de poliadenilação (LOUTEN, 2016).

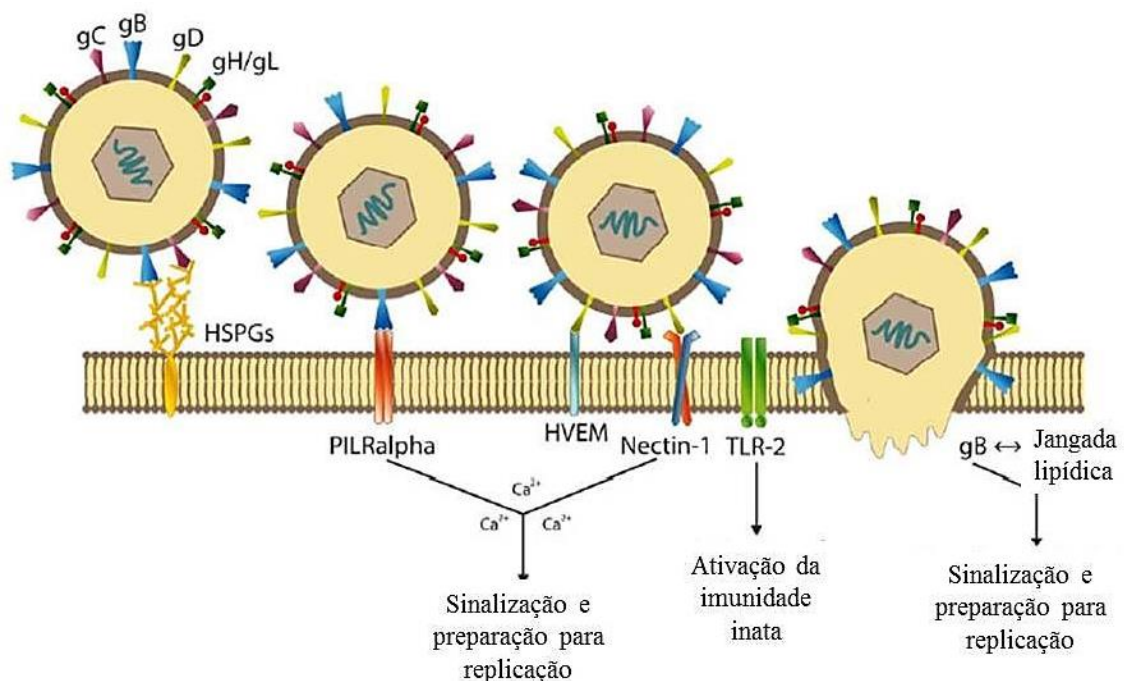
#### **4.4.3 MULTIPLICAÇÃO VIRAL**

Uma característica marcante de todos os vírus do herpes é que eles estabelecem latência, ou seja, os vírus não são completamente eliminados do hospedeiro, mas permanecem dentro das células do corpo em estado dormente (LOUTEN, 2016; CRIMI et al., 2019).

O genoma do herpesvírus codifica genes que podem ser classificados como essenciais ou não essenciais, com base nas necessidades de replicação do vírus. Genes essenciais são necessários para a multiplicação do vírus, de tal forma que os mutantes virais que não possuem esses genes podem apenas estabelecer uma infecção lítica se os genes ausentes forem fornecidos via engenharia genética. Por outro lado, genes não essenciais são frequentemente necessários para interações de células hospedeiras de vírus, como a evasão da resposta imune do hospedeiro, por exemplo (MANSERVIGI, 2010; LOUTEN, 2016; RYU, 2017; BURRELL, HOWARD e MURPHY, 2017).

O ciclo de multiplicação do vírus começa com a adsorção do vírus à célula hospedeira mediada por glicoproteínas virais. A penetração do vírus pode ser realizada por endocitose ou fusão. No primeiro caso, a endocitose parece ser única porque provavelmente

não é mediada pela formação de cavidades revestidas de clatrina ou cavéolas. A penetração viral por fusão requer a participação de múltiplas glicoproteínas virais (gB, gC, gD, gH e gL) e receptores celulares. A penetração é iniciada pela interação de gC viral e/ou gB com o sulfato de heparano (HS), seguido pela interação de gD com um dos seus três receptores. Estes receptores incluem HVEM, um membro da família do receptor do fator de necrose tumoral; nectina-1 (CD111), um membro da superfamília de IgG; nectina 2 e sulfato de heparina 3-O-sulfatado ou 3-OS HS. A ligação de gD ao seu receptor é essencial para a penetração viral, o que acaba por resultar na deposição de DNA viral para replicação no núcleo (Figura 19) (MANSERVIGI, 2010; LOUTEN, 2016; RYU, 2017; BURRELL, HOWARD e MURPHY, 2017).

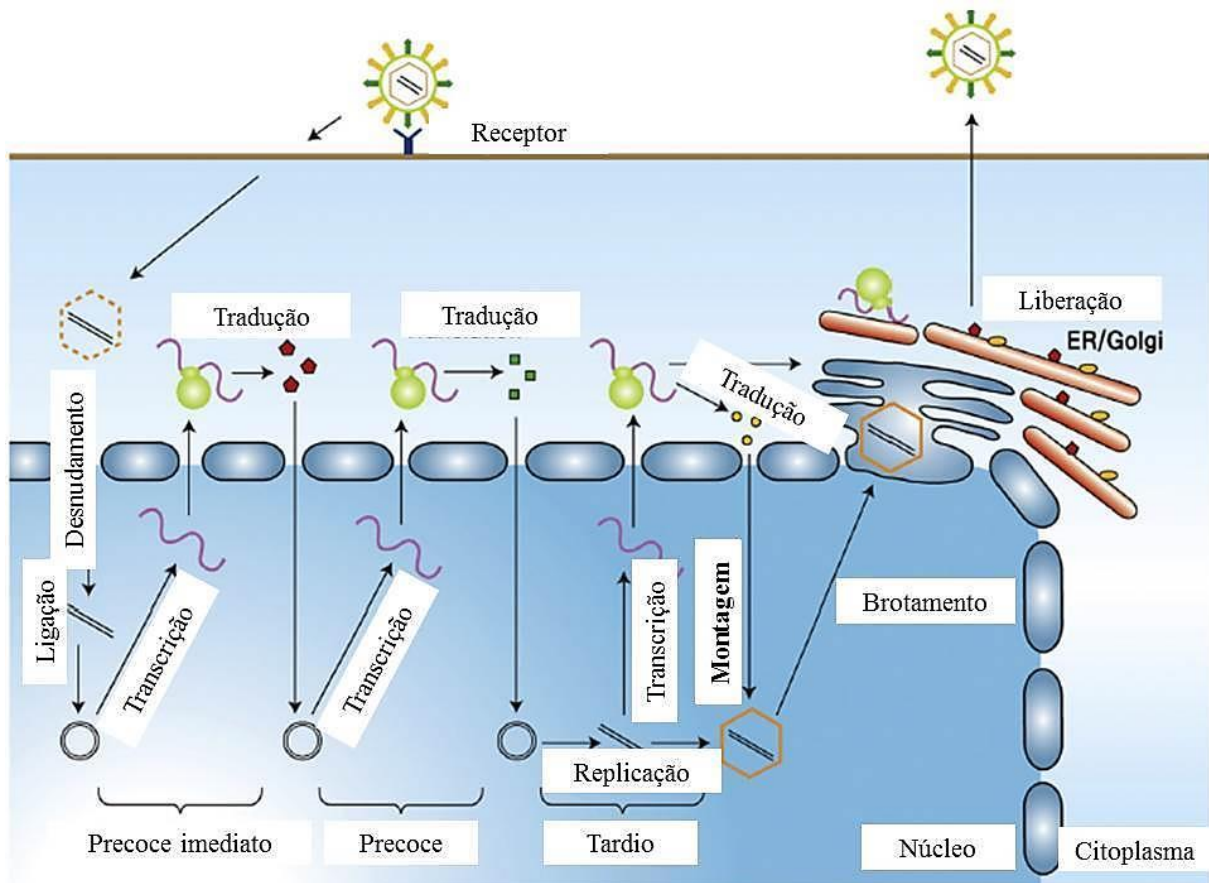


**Figura 19. Mecanismo de penetração do herpesvírus humano 1 na célula hospedeira.** O contato inicial do vírus com a célula é a ligação aos proteoglicanos do sulfato de heparano (HS) na superfície celular, mediada por gC e gB, com a consequente ligação de gB ao receptor PILRalpha. Posteriormente, a gD se liga a um de seus receptores celulares, incluindo o HVEM, um membro da família de receptores de TNF; nectina-1 ou 2, dois membros relacionados da superfamília de imunoglobulinas; ou locais gerados no HS pela ação de 3-O sulfotransferases específicas. Essa última ligação desencadeia a fusão entre a membrana celular e o envelope viral, o que requer a ação de gB, gD e gH-gL, com subsequente liberação do nucleocápside viral e do tegumento no citoplasma. Estratégias de terapia gênica destinadas a direcionar a infecção viral a células específicas podem ser obtidas através da modificação dos primeiros passos do ciclo viral, isto é, adsorção e penetração. As três principais glicoproteínas envolvidas nessas duas fases são gB, gC e gD e seu backbone ORF foi projetado para redirecionar a infecção para a célula alvo, excluindo regiões que afetam a ligação aos principais receptores do herpesvírus humano 1 e / ou inserindo ligantes que favorecem a interação com novos receptores. As

glicoproteínas do envelope do alphaherpesvírus humano 1 também podem interagir com TLRs na superfície celular, desencadeando sinais que estimulam a imunidade inata (Adaptado de MANSERVIGI, 2010).

A penetração de alphaherpesvírus humano 1 nas células envolve interações entre a proteína de ligação ao receptor viral gD e os receptores gD. Quando gD se liga a seus receptores, existem mudanças conformacionais em gD que aparentemente ativam gB e gH/gL, de modo que essas glicoproteínas promovem a fusão envolvendo o vírus e as membranas celulares (MANSERVIGI, 2010; LOUTEN, 2016; RYU, 2017; BURRELL, HOWARD e MURPHY, 2017).

Após a internalização, as partículas de alphaherpesvírus humano 1 sem o envelope migram para o núcleo onde os genes virais são expressos em uma sequência temporal fortemente regulada e consistem em funções do gene precoce imediato (IE), precoce (E) e tardio (L). Os produtos do gene IE (ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 e ICP47) induzem a expressão dos genes E, que codificam as enzimas necessárias para a replicação viral do DNA. Os genes L expressam proteínas estruturais que são utilizadas na morfogênese de novas partículas virais no núcleo. O envelope é adquirido por brotamento através da membrana nuclear com posterior processamento no complexo de Golgi. O ciclo de multiplicação do vírus induz a uma rápida morte celular e liberação de novas partículas virais durante a lise celular (Figura 20) (MANSERVIGI, 2010; LOUTEN, 2016; RYU, 2017; BURRELL, HOWARD e MURPHY, 2017).



**Figura 20. O ciclo de multiplicação do alfa herpesvírus humano 1.** O vírus penetra na célula por fusão direta ou endocitose (para maior clareza, apenas a entrada por fusão direta é mostrada). Após a internalização do vírus, o genoma DNA linear é entregue ao núcleo e convertido em uma forma circular no núcleo. A expressão do gene viral pode ser dividida em três fases: fase precoce imediata, fase precoce e fase tardia. A montagem ocorre no núcleo. O capsídeo montado é eliminado pela membrana nuclear e depois pela via secretora. (Adaptado de RYU, 2017).

O alfa herpesvírus humano 1 é um vírus neurotrópico. Após o ciclo lítico inicial nas células epiteliais da lesão primária, as progênes virais penetram nos neurônios sensoriais cujos terminais de axônio inervam a área afetada. O nucleocapsídeo e o tegumento são transportados retrogradamente ao longo dos axônios do local de entrada para a soma neuronal, onde o DNA viral e o VP16 entram no núcleo. Desse modo, o vírus pode entrar no estado latente ou iniciar o ciclo lítico (MANSERVIGI, 2010; LOUTEN, 2016; RYU, 2017; BURRELL, HOWARD e MURPHY, 2017).

Durante a infecção latente, o genoma viral persiste como um elemento epissômico estável, sem expressão detectável dos produtos do gene IE, E ou L. Apenas um conjunto de espécies de RNA não traduzidas, conhecidas como transcrições latentes associadas (LATs),

são sintetizadas durante a latência. Em uma fração dos neurônios que contêm o alphaherpesvírus humano 1 latente, o vírus é periodicamente reativado. A expressão em cascata dos genes virais IE, E e L é reativada, o que resulta na produção de vírions. As partículas virais infecciosas são transportadas para os terminais nervosos periféricos por via de transporte axonal anterógrada, liberadas e infectam as células no local ou próximo do local da infecção inicial (MANSERVIGI, 2010).

#### **4.5 ALPHAHERPESVIRUS HUMANO 1 APLICADO A VIROTERAPIA ONCOLÍTICA**

O alphaherpesvírus humano 1 é apontado como um dos principais patógenos humanos cujo ciclo de manutenção é baseado em uma interação de longo prazo com o seu hospedeiro, caracterizado pela existência de infecções líticas e latentes. O profundo conhecimento adquirido sobre a genética e biologia molecular desses vírus, permitiu o desenvolvimento de potenciais vetores para diversas aplicações na saúde humana. Estas incluem a entrega e expressão de genes humanos em células do sistema nervoso, destruição seletiva de células cancerosas, profilaxia contra infecção com alphaherpesvírus humano 1 ou outras doenças infecciosas e infecção dirigida de tecidos ou genes específicos (MARCONI et al, 2008).

Desde a primeira descrição sobre o alphaherpesvírus oncolítico, em 1991, usado no tratamento de gliomas malignos, progressos substanciais foram feitos na exploração das características únicas do alphaherpesvírus humano 1 como uma abordagem terapêutica promissora na luta contra o câncer (MARTUZA et al, 1991; VARGHESE e RABKIN, 2002).

Os vetores de alphaherpesvírus humano 1 competentes para multiplicação com mutações em genes que afetam a multiplicação viral, neuropatogenicidade e evasão imunológica foram desenvolvidos e testados quanto à sua segurança e eficácia. Logo, demonstraram-se eficazes contra vários tumores sólidos testados em modelo murino, incluindo glioma, melanoma, mama, próstata, cólon, ovário e câncer pancreático (VARGHESE e RABKIN, 2002).

A eficácia da viroterapia oncolítica com alphaherpesvírus humano 1 foi aumentada quando esses vírus foram combinados com terapias tradicionais, tais como a radioterapia e quimioterapia. Vetores oncolíticos de alphaherpesvírus humano 1 que expressam genes

“suicidas” (timidina cinase, citosina desaminase, citocromo P450) ou genes imunostimuladores (IL-12, GM-CSF, e outros) foram sintetizados para maximizar a eliminação do câncer por meio de mecanismos terapêuticos multimodais (VARGHESE e RABKIN, 2002).

Atualmente, três classes de vetores podem ser derivadas de alphaherpesvírus humano 1: vetores atenuados competentes para multiplicação, vetores recombinantes defeituosos para multiplicação e vetores defeituosos dependentes de “*helper*” (vetores de amplificação), conhecidos como amplicons (LACHMANN, 2004; EPSTEIN et al, 2005; MARCONI et al, 2008; MANSERVIGI, ARGNANI e MARCONI, 2010).

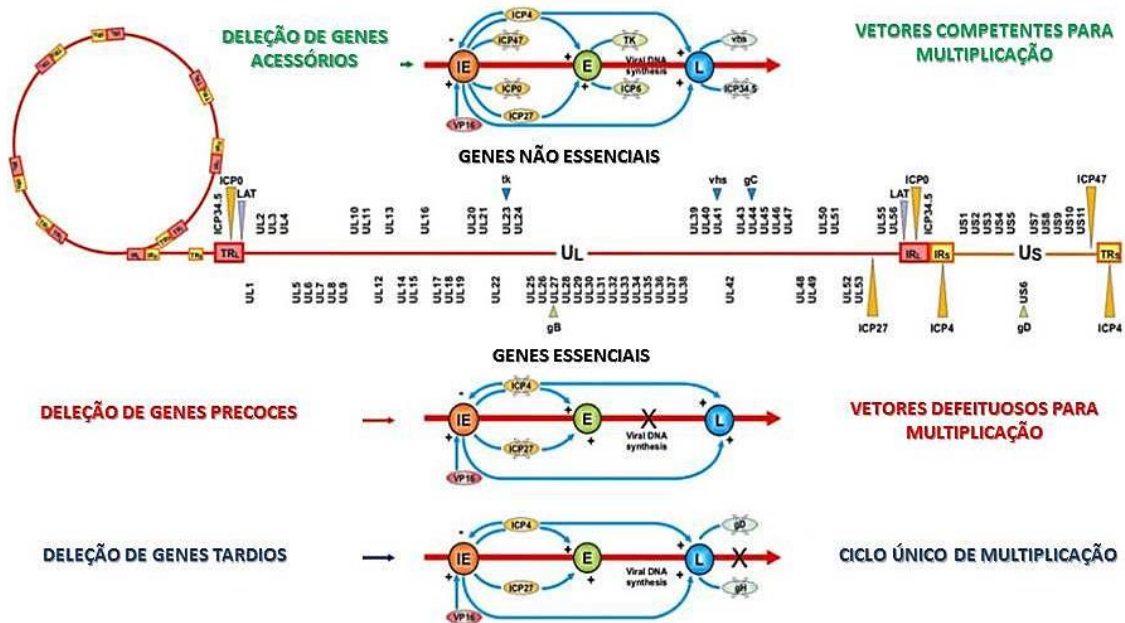
Os vetores de amplificação são partículas de alphaherpesvírus humano 1 idênticas ao alphaherpesvírus humano 1 do tipo selvagem dos pontos de vista estrutural, imunológico e do hospedeiro, mas que carregam uma forma concatamérica de um DNA plasmidial, denominado plasmídeo amplicon, em vez de genoma viral (FRENKEL, SINGER e KWONG, 1994; SENA-ESTEVEES et al, 2000; EPSTEIN, 2005; MARCONI et al, 2008). Os amplicons são projetados para conter tanto a origem de replicação do DNA do alphaherpesvírus humano 1 (*ori*) quanto às sequências de reconhecimento do envoltório de clivagem do Human alphaherpesvirus (*pac*). Quando os amplicons são transfectados em células de mamíferos com funções auxiliares do alphaherpesvírus humano 1, eles são replicados, formam concatâmeros ligados entre a cabeça e a cauda e são então empacotados em partículas virais (EPSTEIN, 2009; MANSERVIGI, ARGNANI e MARCONI, 2010).

Os vetores de amplificação possuem várias vantagens como veículos de entrega de genes. Possuem uma grande capacidade transgênica (teoricamente até 152 kb); o caráter repetitivo do genoma transportado pela partícula de amplicon assegura a introdução de múltiplas cópias do transgene por célula infectada; a capacidade de infectar uma grande variedade de tipos de células, incluindo células dendríticas; facilidade de construção vetorial e a toxicidade limitada devido à ausência de sequências codificadoras virais (MARCONI et al, 2008; MANSERVIGI, ARGNANI e MARCONI, 2010).

Os vetores com multiplicação defeituosa são baseados em vírus mutantes com deleções em um ou mais genes essenciais para o ciclo lítico (TODO, 2002; HU e COFFIN, 2003; MANSERVIGI, ARGNANI e MARCONI, 2010). Portanto, esses mutantes não podem se multiplicar, exceto em células transformadas, onde são complementados em transfecção (MARCONI et al, 2008).



Já os vetores competentes para multiplicação são compostos de vírus atenuados onde genes não essenciais para multiplicação *in vitro* são multados ou deletados. A Figura 21 demonstra, de maneira simplificada, o mapa do genoma do alphaherpesvírus humano 1 e uma representação esquemática dos vetores competentes e defeituosos para multiplicação (TODO, 2002; HU e COFFIN, 2003; MANSERVIGI, ARGNANI e MARCONI, 2010).



**Figura 21.** Mapa do genoma do alphaherpesvírus humano 1 e representação esquemática de vetores competentes e defeituosos para multiplicação. É representada de maneira esquemática a posição dos genes que codificam proteínas envolvidas na replicação do genoma, regulação, formação e montagem do vírus e das proteínas estruturais dos vírions. Genes que são modificados ou excluídos para alcançar a atenuação viral são indicados (Adaptado de MANSERVIGI, ARGNANI e MARCONI, 2010).

As primeiras tentativas de utilizar o alphaherpesvírus humano 1 como vetor oncolítico foram focadas na mutação/exclusão de um único gene que restringia sua multiplicação às células tumorais, levando ao desenvolvimento de vetores atenuados de primeira geração (VARGHESE e RABKIN, 2002; MANSERVIGI, ARGNANI e MARCONI, 2010). Três desses mutantes de alphaherpesvírus humano 1 foram sintetizados: (1) dlsptk, contendo uma deleção no gene tk (MARTUZA et al, 1991); (2) hrR3, contendo uma inserção do gene lac-Z de *Escherichia coli* no gene precoce UL39, codificando a grande subunidade do ribonucleotídeo redutase (RR) viral (ICP6) (KRAMM et al, 1996; JEYARETNA, RABKIN e MARTUZA, 2007) e (3) R3616 contendo deleções de 1kb em ambas as cópias do gene  $\gamma$ -34.5, codificando o fator de neurovirulência ICP34.5 (ANDREANSKY et al, 1997;



CASSADY, GROSS e ROIZMAN, 1998; DAMBACH et al, 2006; MANSERVIGI, ARGNANI e MARCONI, 2010; VARGHESE e RABKIN, 2002).

O primeiro vetor de alphaherpesvírus humano 1 foi denominado dlsptk e direcionado para terapia de tumor cerebral (MARTUZA et al, 1991). Os mutantes de tk são altamente neuroatenuados (MANSERVIGI, ARGNANI e MARCONI, 2010). Quando camundongos atímicos contendo gliomas humanos malignos intracerebrais foram tratados com dlsptk, sobreviveram por mais tempo e apresentaram curas completas (BOVIATSISS et al, 1994; KRAMM et al, 1997; CARROL et al, 1997; VARGHESE e RABKIN, 2002; MANSERVIGI, ARGNANI e MARCONI, 2010).

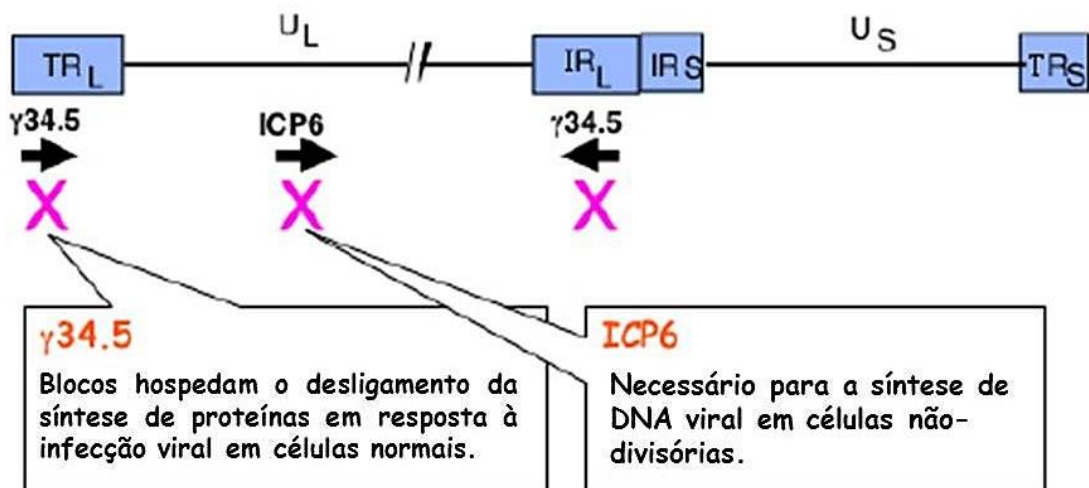
Contudo, esse mutante apresentou grande toxicidade em altos títulos virais e, seu status de tk negativo, tornou-o resistente aos tratamentos anti-herpéticos tradicionais; o que gerou grandes inconvenientes para o seu uso clínico (BOVIATSISS et al, 1994; KRAMM et al, 1997; CARROL et al, 1997; VARGHESE e RABKIN, 2002; MANSERVIGI, ARGNANI e MARCONI, 2010). Entretanto, esse primeiro mutante serviu como prova primária de que os mutantes atenuados do alphaherpesvírus humano 1 tinham potencial terapêutico. Assim, o próximo passo foi voltado para o desenvolvimento adicional de vetores de alphaherpesvírus humano 1, com mutações em outros genes que afetavam a virulência do vírus (VARGHESE e RABKIN, 2002).

Um desses vetores foi o hrR3, um mutante RR - negativo, com uma inserção no molde do gene LacZ de *Escherichia coli* no locus ICP6. Essa alteração no locus ICP6, resultou na diminuição da neurovirulência, possibilitando a eficácia no tratamento de gliomas malignos (GOLDSTEIN e WELLER, 1988; CAMERON et al, 1988; YAMADA et al, 1991; MINETA, RABKIN e MARTUZA, 1994; BOVIATSISS et al, 1994; VARGHESE e RABKIN, 2002). Contudo, como os mutantes tk, também apresentavam neurotoxicidade quando utilizados em doses mais altas e uma margem de segurança ineficaz para testes em humanos (CHAMBERS et al, 1995; KRAMM et al, 1996; MANSERVIGI, ARGNANI e MARCONI, 2010).

Outro conjunto de vetores de alphaherpesvírus humano 1 contém deleções no gene  $\gamma$ 34.5, principal determinante viral de neuropatogenicidade (THOMPSON, WAGNER e STEVENS 1983; CHOU et al, 1990), e inclui os mutantes 1716 e R3613, ambos utilizados com sucesso para tratar uma variedade de modelos de câncer animal (VARGHESE e RABKIN, 2002). O uso de vírus mutantes  $\gamma$ 34.5 demonstrou considerável eficácia

antitumoral, combinada com um bom perfil de segurança, e diferentes versões de deleção de alphaherpesvírus humano 1 ICP34.5 estão em testes clínicos em humanos (LIU et al, 2003; MANSERVIGI, ARGNANI e MARCONI, 2010). Todos esses vetores alphaherpesvírus humano 1 de primeira geração forneceram a base para examinar questões críticas de segurança, especificidade e eficácia para a viroterapia oncolítica (VARGHESE e RABKIN, 2002).

Após testes clínicos com os vetores alphaherpesvírus humano 1 de primeira geração foram criados os vetores alphaherpesvírus humano 1 multimutados ou de segunda geração, de modo a maximizar a segurança. Um desses representantes é o G207; esse vetor contém deleções em ambos os locos do gene  $\gamma 34.5$ , o principal determinante de neurovirulência do alphaherpesvírus humano 1 (Figura 22) (CHOU et al, 1990; TODO, 2008) e inserção de um gene lac-Z no locus ICP6 (VARGHESE e RABKIN, 2002; TODO, 2008; MANSERVIGI, ARGNANI e MARCONI, 2010). Os vetores de alphaherpesvírus humano 1 deficientes em  $\gamma 34.5$  são consideravelmente atenuados em células normais, porém mantêm a capacidade de multiplicação no interior de células neoplásicas (TODO, 2008).



**Figura 22. Estruturas do G207.** O genoma do alphaherpesvírus humano 1 consiste em regiões únicas e longas (UL e US), cada uma delimitada por regiões de repetição terminal (T) e interna (I) (RL e RS). O G207 foi manipulado a partir da estirpe F do alphaherpesvírus humano 1 de tipo selvagem, eliminando 1kb em ambas as cópias do gene  $\gamma 34.5$  e inserindo o gene lacZ de *E.coli* na região codificadora de ICP6 (Adaptado de TODO, 2008).

Estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* demonstraram a eficácia do G207 contra vários outros tumores, incluindo melanoma, câncer de mama humano em modelo metastático

cerebral (TODA, RABKIN e MARTUZA, 1998), cólon e metástases hepáticas (KOOBY et al, 1999), vesicular biliar, estômago, carcinoma escamoso de cabeça e pescoço (CAREW et al, 1999), além de câncer de ovário, pâncreas (McAULIFFE et al, 2000) e próstata (TODO et al, 2002; VARGHESE e RABKIN, 2002; ); exceto naqueles derivados de medula óssea (TODO et al, 2001; TODO, 2008; MANSERVIGI, ARGNANI e MARCONI, 2010).

Em linhas celulares de glioma humano e meningioma maligno, por exemplo, G207 eliminou totalmente a população de células em um período de 2 a 6 dias a uma MOI de 0,1 (MINETA et al, 1995; YAZAKI et al, 1995; TODO, 2008). Ainda, a inoculação intraneoplásica de G207 em camundongos imunocompetentes, induziu uma imunidade antitumoral sistêmica (TODO et al, 1999; TODO et al, 1999; TODO, 2008), levando à regressão de um tumor distante e à resistência a reincidência com células tumorais autólogas (TODA et al, 1999; VARGHESE e RABKIN, 2002; TODO 2008).

G47 $\Delta$  é um vetor de terceira geração que foi sintetizado por deleção do gene US12, codificador da proteína ICP47 (produto do gene  $\alpha$ 47), que normalmente bloqueia a apresentação de antígeno mediada pela classe I do (complexo principal de histocompatibilidade) MHC em células infectadas (YORK et al, 1994). Assim, as células de melanoma humano infectadas com G47 $\Delta$  expressaram níveis mais elevados de MHC de classe I na superfície, em comparação com células infectadas com G207, resultando em uma maior estimulação de linfócitos infiltrantes de tumor (TODO et al, 2001). G47 $\Delta$  mostrou-se eficaz em modelos de tumores em animais de uma variedade de cânceres incluindo tumores cerebrais, câncer de próstata e mama (TODO et al, 2001; FUKUHARA et al, 2005; LIU, VARGHESE e RABKIN, 2005; MESSERLI et al, 2006; TODO, 2008).

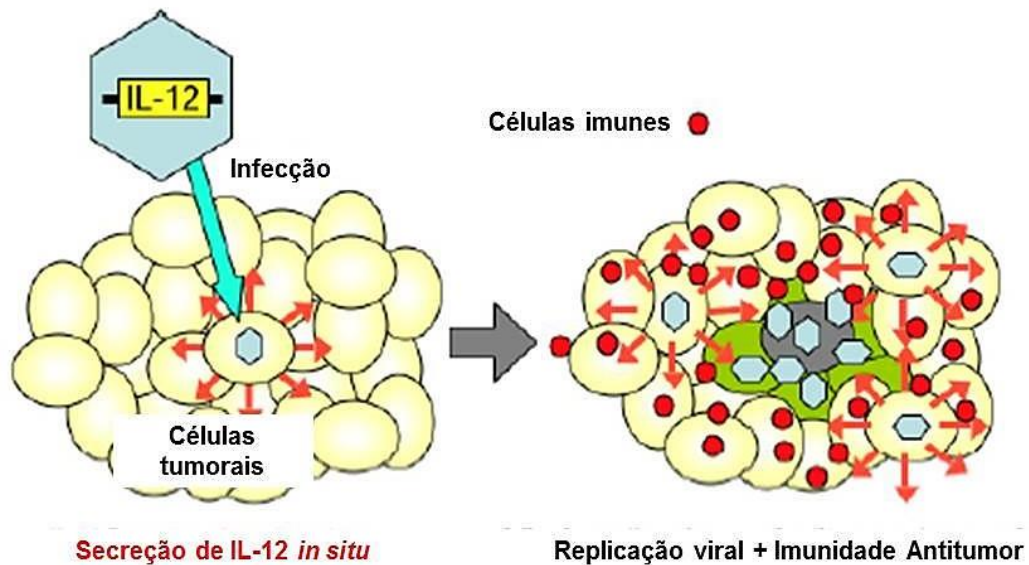
Outro vetor de alphaherpesvírus humano 1 com as mesmas características de G47 $\Delta$  foi isolado após passagens seriadas de um alphaherpesvírus humano 1 ICP34.5 nocaute, em linhas celulares tumorais. Foi demonstrado que este isolado viral exibia um efeito antitumoral melhorado no câncer de próstata (TANEJA et al, 2001; MANSERVIGI, ARGNANI e MARCONI, 2010). Na maioria das linhagens celulares testadas, G47 $\Delta$  multiplicou-se melhor que G207, resultando na geração de títulos virais mais elevados e exibindo maior efeito citopático (TODO et al, 2001). A multiplicação melhorada do G47 $\Delta$  foi associada a uma maior atividade antitumoral (TODO, 2008; MANSERVIGI, ARGNANI e MARCONI, 2010).

Os vetores de última geração são baseados em vetores que expressam transgenes. Os vetores de alphaherpesvírus humano 1 oncolíticos foram modificados para aumentar a sua

eficácia antitumoral, por incorporação de cassetes de expressão para a entrega de vários transgenes. Nesse contexto, destacam-se os vetores de alphaherpesvírus humano 1 ativadores de pró-fármaco, vetores imunoestimuladores de alphaherpesvírus humano 1 e os vetores de utilizando abordagens antiangiogênicas (MANSERVIGI, ARGNANI e MARCONI, 2010).

Os alphaherpesvírus humano 1 oncolíticos foram testados, os quais codificam diferentes sistemas de ativação de pró-fármacos além da atividade de tk endógena do vírus. Tanto sistema pró-fármaco de 5-fluorocitosina (5-FC)/citosina desaminase de levedura (CD) (NAKAMURA et al, 2001), sozinho ou em combinação com o sistema tk/ganciclovir (TODA, MARTUZA e RABKIN, 2001; AGHI et al, 1998), e o citocromo P-450 (CYP2B1), que converte a ciclofosfamida (CPA) em seus metabólitos ativos, são usados para concentrar os metabólitos tóxicos em células infectadas por vírus e mostraram induzir efeitos benéficos (AGHI et al, 1999; PAWLIK et al, 2002; CURRIER et al, 2008). Um novo alphaherpesvírus humano 1 oncolíticos, o MGH-2, foi sintetizado utilizando essa abordagem e apresentou eficácia antitumoral aumentada contra células de glioma humano tanto *in vitro* como *in vivo* quando combinado com ciclofosfamida e CPT-11 (MANSERVIGI, ARGNANI e MARCONI, 2010).

Moléculas incluindo interleucinas e interferons foram testadas com alphaherpesvírus humano 1 oncolíticos como vetores imunoestimuladores. Entre elas, interleucinas do tipo 4 (IL-4) , IL-10 e IL-12 (ANDREANSKY et al, 1998; PARKER et al, 2000; WONG et al, 2001; BENNETT et al, 2001; WONG et al, 2004; WONG et al, 2004) fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) (TODA, MARTUZA e RABKIN, 2000; WONG et al, 2001; LIU et al, 2003) e B7-1 solúvel (TODO et al, 2001), que aumentam o reconhecimento imunológico do tumor. Esta abordagem também reduz a toxicidade derivada da administração sistêmica da citocina (MANSERVIGI, ARGNANI e MARCONI, 2010). As moléculas imunoestimuladoras potencializam a indução de imunidade antitumoral levando ao aumento da atividade oncolítica viral, o que resulta em ampla atividade antitumoral (Figura 23) (TODO, 2008).



**Figura 23. Estratégia de terapia oncolítica usando o alphaherpesvírus humano 1 oncolítico associado a um gene imunestimulador.** Quando o alphaherpesvírus humano 1 expressando o gene da interleucina 12 (IL-12) infecta células tumorais, a IL-12 é secretada no curso da multiplicação viral e estimula as células do sistema imunológico. Além da morte direta das células tumorais via multiplicação e disseminação viral, as células tumorais são destruídas pela potencialização das respostas imunes antitumorais, o que resulta atividades antitumorais melhoradas (Adaptado de TODO, 2008).

Vetores competentes para replicação expressando IL-4 e IL-10 foram avaliados em um modelo ortotópico de GMP murino (ANDREANSKY et al, 1998). Neste modelo de tratamento, o uso de alphaherpesvírus humano 1 expressando IL-4 aumentou a sobrevivência dos animais em relação ao tratamento apenas com alphaherpesvírus humano 1, sugerindo que a terapia gênica combinada à liberação de citocinas pode gerar uma resposta específica para o tumor (MANSERVIGI, ARGNANI e MARCONI, 2010).

Vale destacar que a IL-12 também possui propriedades antiangiogênicas, que podem representar um segundo mecanismo potencial de sua atividade antitumoral (DEL VECCHIO et al, 2007). Essa propriedade da IL-12 e sua eficácia foram testadas em modelos animais de carcinoma de células escamosas (WONG et al, 2004). Muitos vetores expressando IL-12 foram testados em diferentes modelos tumorais (PARKER et al, 2000; WONG et al, 2001; BENNETT et al, 2001; WONG et al, 2004; WONG et al, 2004), demonstrando eficácia tanto no tratamento do tumor quanto na prevenção de recidivas após a ressecção tumoral (JARNAGIN et al, 2003).

Ainda, foi demonstrado que um alphaherpesvírus humano 1 oncolítico, JS1/ICP34.5/ICP47/GM-CSF, denominado OncoVex, derivado de um isolado clínico de alphaherpesvírus humano 1 e modificado para expressar GM-CSF, possui uma maior capacidade para matar células tumorais *in vitro* e *in vivo* (LIU et al, 2003). O OncoVex demonstrou resultados promissores tanto no estudo de escalonamento de dose de fase I/II para câncer de células escamosas da cabeça e pescoço (HU et al, 2006) quanto no ensaio clínico de fase II para melanoma maligno irresssecável (SENZER et al, 2009; KAUFMAN et al, 2010).

A angiogênese tem um papel crítico no desenvolvimento de tumores e metástases. Sendo assim, novas terapias antiangiogênicas são desejáveis (LIU et al, 2006; BRANDWIJK, GRIFFIOEN, THIJSSSEN, 2007; NORDEN, DRAPPATZ e WEN, 2008; TYSOME, LEMOINE e WANG, 2009). Logo, foram desenvolvidas estratégias para inibir a angiogênese tumoral, seja através de vetores de alphaherpesvírus humano 1 com transgenes antiangiogênicos ou com um tratamento combinado com compostos antiangiogênicos e alphaherpesvírus humano 1 (WONG et al, 2004; MULLEN et al, 2004; BENENCIA et al, 2005; LIU et al, 2006; LIU et al, 2008).

Em um estudo de MULLEN et al (2004), o gene da endostatina murina foi incorporado ao genoma do alphaherpesvírus humano 1. Verificou-se que a endostatina produzida inibia a angiogênese em um modelo de carcinoma do cólon HT29 humano. Em um segundo estudo de LIU et al (2008), uma administração sistêmica concomitante de tricostatina A (TSA) e alphaherpesvírus humano 1 intratumoral, G47 $\Delta$ , resultou em antiangiogênese aumentada e potencializou a eficácia antitumoral em modelos animais (MANSERVIGI, ARGNANI e MARCONI, 2010). A tabela 3 mostra um resumo dos vetores oncolíticos de alphaherpesvírus humano 1 e ensaios clínicos com alguns deles (MANSERVIGI, ARGNANI e MARCONI, 2010).

**TABELA 3. VETORES ONCOLÍTICOS DE ALPHAHERPESVÍRUS HUMANO 1 E  
ENSAIOS CLÍNICOS**

<b>Cepa</b>	<b>Modificação Genética</b>	<b>Transgenes Terapêuticos</b>	<b>Estágio</b>	<b>Indicações Clínicas</b>
dlspk	Deleção tk	Nenhum	Pré-clínico	
hrR3	Ruptura UL39 (subunidade RR grande)	Nenhum	Pré-clínico	
alphaherpesvírus humano 1 1716	Exclusão em ambas as cópias do ICP34.5	Nenhum	Ensaios clínicos humanos Fase I (recrutamento ainda não aberto)	Glioma, melanoma, câncer de cabeça e pescoço. Tumores sólidos não-SNC
R3616	Exclusão em ambas as cópias do ICP34.5	Nenhum	Pré-clínico	
R4009	Stop códon em ambas as cópias do ICP34.5	Nenhum	Pré-clínico	
G207	Eliminação em ambas as cópias do ICP34.5 + interrupção do UL39	Nenhum	Ensaios clínicos humanos fase I, IB e II	Cancro cerebral recorrente (glioma, astrocitoma, glioblastoma)
MGH-1	Eliminação em ambas as cópias do ICP34.5 + interrupção do UL39	Nenhum	Pré-clínico	
MGH-2	Eliminação em ambas as cópias do ICP34.5 + interrupção do UL39	CYP2B1 e shICE	Pré-clínico	
R7020 (NV1020)	Deleção em uma cópia de ICP34.5 + tk sob controle do promotor de ICP4 + deleção em UL24, 55 e 56	Nenhum	Ensaios clínicos humanos fase I e II	Fígado, metástases derivadas de câncer colorretal.
G47Δ	Eliminação em ambas as cópias do ICP34.5 + interrupção do UL39	Nenhum	Pré-clínico	
Myb34.5	Deleção em ambas as cópias de ICP34.5 + ruptura da inserção UL39 + de um gene ICP34.5 sob o controle do promotor B-myc		Pré-clínico	
DF3γ34.5	Deleção em ambas as cópias de ICP34.5 + inserção de um gene ICP34.5 sob o controle do promotor DF3 / MUC1	Nenhum	Pré-clínico	
HF10	Geração espontânea da	Nenhum	Ensaios	

	variante HSC-1		clínicos humanos	
NV1042	alphaherpesvírus humano 1 / alphaherpesvírus humano 1 -2 inter-trip recombinante + contém apenas uma cópia de ICP34.5	IL-12 murino	Pré-clínico	
OncoVexGMCSF	Supressão em ambas as cópias da ICP34.5 + supressão do ICP47	GM-CSF	Fase II/III	Câncer de mama, câncer de cabeça e pescoço, melanoma
RAMBO	Exclusão em ambas as cópias da interrupção ICP34.5 + UL39	IE4 / 5 prom-Vstat120	Pré-clínico	
NP2 enkephalin expressing vetor	Deleções no ICP4, 27, 22 e 47	preproenkephalin humano	Fase I	Dor crônica de câncer terminal

Fonte: Adaptado de MANSERVIGI, ARGNANI e MARCONI (2010, p. 137).

Atualmente, o foco das pesquisas com alphaherpesvírus humano 1 oncolítico modificado passou para o “talimogene laherparepvec”, um alphaherpesvírus humano 1 imunostimulador que expressa um fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) (LIU et al, 2003). A injeção intratumoral de “talimogene laherparepvec” revelou uma melhora significativa na taxa de resposta durável (DRR) em pacientes com melanoma (16,3%) em comparação com controles (2,1%). A regressão tumoral foi observada em lesões distantes da injeção, sugerindo o estabelecimento de imunidade antitumoral sistêmica (GOLDSMITH et al, 1998; LAWER et al, 2017).

O “talimogene laherparepvec” foi derivado de um alphaherpesvírus humano 1 isolado de uma amostra clínica e possui uma deleção para os genes ICP34 e ICP47. A expressão desses genes, resulta no bloqueio da apresentação de antígeno pelo MHC-1 na interação alphaherpesvírus humano 1 e célula infectada, auxiliando na evasão do sistema imune (GOLDSMITH et al, 1998; LAWER et al, 2017).

#### **4.6 ALPHAHERPESVÍRUS HUMANO 1 APLICADOS À VIROTERAPIA ONCOLÍTICA EM METÁSTASES DE CÂNCER DE MAMA**

O alphaherpesvírus humano 1 possui características singulares e atraentes para aplicação na viroterapia oncolítica do câncer de mama: (1) infecta uma ampla variedade de tipos celulares e seus receptores celulares (HS, PILR $\alpha$ , HVEM e nectina-1 e 2), são amplamente expressos na superfície celular de numerosos tipos de células (MANSERVIGI,



ARGNANI e MARCONI, 2010); (2) infecta a maioria dos tipos de células tumorais, especialmente em comparação com os adenovírus (TODO, 2008); (3) é naturalmente citolítico, ou seja, o ciclo de vida do vírus resulta na lise da célula hospedeira; (4) possui um grande genoma (152 kb) muito bem caracterizado e que contém muitos genes não essenciais que podem ser substituídos (até 30 kb) por inúmeros transgenes terapêuticos; (5) possui vários genes não essenciais associados à neurovirulência; (6) inúmeros fármacos anti-herpéticos estão disponíveis como proteção caso haja uma multiplicação desfavorável do vírus; (7) o genoma viral permanece como um epissoma no interior da célula hospedeira, mesmo durante a latência, o que impede a mutagênese insercional (VARGHESE e RABKIN, 2002; GOINS, 2014); (8) apresenta uma maior infectividade quando comparado com outros vírus, tais como adenovírus e adenoassociados, por exemplo; (9) uma multiplicidade relativamente baixa de infecção (MOI) é necessária para eliminar células infectadas (KIMATA et al, 2006; TODO, 2008); (10) as reações imunes do hospedeiro aumentam os efeitos antitumorais; (11) o anticorpo anti-alphaherpesvírus humano 1 circulante não afeta a disseminação célula-a-célula do vírus (TODO, 2008).

O alphaherpesvírus humano 1 possui glicoproteínas de superfície (gP) localizadas no envelope viral. Essas proteínas são importantes ligantes virais e possuem atividade imunógena. Modificações em algumas dessas gPs é uma estratégia visando o redirecionamento desses vírus para receptores específicos expressos em células do câncer de mama (COBLEIGH et al, 1990).

Um exemplo desses receptores é o receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2 (HER-2) comumente superexpresso em alguns subtipos de carcinoma de mama (COBLEIGH et al, 1990). Dessa forma, foi sintetizado o alphaherpesvírus humano 1 oncolítico R-LM249, o qual contém o anticorpo de cadeia simples “trastuzumab” anti-HER no domínio da gD (MENOTTI et al, 2008). Logo, o alphaherpesvírus humano 1 oncolítico R-LM249 pode ser redirecionado com êxito para o receptor HER-2 em células de câncer de mama (MENOTTI et al, 2009).

Além disso, a análise *in vivo* demonstrou que o tratamento de camundongos com o alphaherpesvírus humano 1 oncolítico R-LM249 não apresentou sinais de toxicidade, além de inibir o crescimento tumoral positivo para HER-2 e, em alguns casos promoveu a remissão completa do tumor (MENOTTI et al, 2009; O'BRYAN e MATHIS, 2018).

A partir de outra estratégia, o alphaherpesvírus humano 1 oncolítico G47 $\Delta$  mostrou-se promissor. Esse vírus foi desenvolvido a partir de múltiplas mutações gênicas também visando direcionar a multiplicação para células de câncer mamário. As mutações adicionais nos genes ICP6 e  $\alpha$ 47 restringiram a multiplicação viral às células em divisão (CARROL et al, 1996) e melhoraram a estimulação imunológica (YORK et al, 1994).

Em um estudo para o tratamento de metástase mamária pulmonar com G47 $\Delta$ , o vírus diminuiu de maneira significativa o número de tumores em comparação com o controle (WANG et al, 2012). Adicionalmente, o G47 $\Delta$  foi testado com êxito em células tronco de câncer de mama, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, a fim de avaliar a sua capacidade de infectar células-tronco que contribuem para o crescimento do tumor (LI et al, 2012). Em células e tumores de câncer de mama resistentes ao tamoxifeno, o G47 $\Delta$  se revelou capaz de infectar, multiplicar e reduzir o crescimento do tumor, o que demonstrou o seu potencial como terapia adjuvante na clínica (FAN et al, 2016).

Em uma tentativa de elucidar o questionamento quanto à diminuição da virulência associada à deleção de  $\gamma$ 34.5, em um estudo recente foi introduzido o terminal C da subunidade reguladora da proteína fosfatase I murina 15A (MyD116) no terminal N do gene  $\gamma$ 34.5 em um recombinante G47 $\Delta$  (GD116). Esta inserção melhorou a multiplicação do GD116 em células de tumor de mama *in vitro*, assim como a citotoxicidade, acarretando em uma possível estratégia para desenvolver o alphaherpesvírus humano 1 com maior eficiência (CHENG et al, 2018; O'BRYAN e MATHIS, 2018).

Alguns vetores de alphaherpesvírus humano 1 foram associados a proteínas, enzimas ou fármacos que combatem o câncer para obter um efeito terapêutico mais prolongado. No tratamento do câncer mamário, o vírus OSVP baseado no alphaherpesvírus humano 1 oncolítico incorporou um gene de 15-hidroxiprostaglandina desidrogenase, responsável por codificar uma enzima que quebra a prostaglandina promotora do tumor. Em modelos de camundongos de câncer de mama ortotópico e metastático, este alphaherpesvírus humano 1 oncolítico inibiu o crescimento do tumor, da metástase e até mesmo contribuiu para a estimulação imunológica após o tratamento (WALKER, SEHGAL e KOUSOULAS, 2011; O'BRYAN e MATHIS, 2018).

Nos últimos anos, o vírus oVHV HF10, uma amostra naturalmente multada, foi avaliado em pacientes com câncer de mama humano. Em um estudo, pacientes com câncer de

mama que tiveram recorrências foram tratados com doses únicas ou repetidas de HF10 injetadas em nódulos de tumor único. De maneira curiosa, esses pacientes apresentaram reduções no tamanho do tumor e infiltração de células T CD8+ que sugeriam uma resposta antitumoral (SAHIN et al, 2011; O'BRYAN e MATHIS, 2018).

Diversos estudos avaliaram a eficácia do alphaherpesvírus humano 1 em combinação com outros tratamentos, como quimioterápicos, imunoterapias e terapias direcionadas. O alphaherpesvírus humano 1MGH2, foi avaliado conjuntamente com a expressão de caspase 8 induzida pela doxíciclina, TRAIL recombinante e/ou quimioterapia com paclitaxel. O tratamento *in vivo* com doxíciclina para induzir a expressão de caspase 8, resultou em apoptose que aumentou a infecção por MGH2, o que facilitou a disseminação do vírus e, portanto, aumentou a morte celular por via intratumoral. O pré-tratamento com uma combinação de paclitaxel – TRAIL também elevou a disseminação de MGH2 nos tumores e contribuiu para aumentar a apoptose e necrose tumoral (NAGANO et al, 2008).

De maneira similar, um alphaherpesvírus humano 1 oncolítico expressando a interleucina-12 (IL-12), M002 também exibiu aumento da multiplicação em células de câncer de mama (CODY, MARKERT e HURST, 2014). Outro alphaherpesvírus humano 1 oncolítico, alphaherpesvírus humano 1-hGM-CSF, foi sintetizado transcricionalmente para atacar células de câncer de mama e produzir fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos humanos durante a multiplicação (ZHUANG et al, 2012). O tratamento com alphaherpesvírus humano 1-hGM-CSF administrado com o agente quimioterápico doxorubicina foi capaz de reduzir significativamente o volume do tumor em um modelo murino com câncer de mama quando comparado a qualquer tratamento isoladamente (O'BRYAN e MATHIS, 2018).

Em uma abordagem recente e inovadora, combinou-se o alphaherpesvírus humano 1 específico de glioma, rQNestin34.5 com células natural killer (NK) modificadas por receptor de antígeno quimérico (CAR) expressando uma fusão de anticorpos EGFR (Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico) (EGFR-CAR-NK-92). Esta abordagem pode ter como alvo células tumorais que expressam EGFR e células cancerígenas EGFR negativas no tumor. Nesse caso, as metástases cerebrais de câncer de mama foram inicialmente tratadas intratumoralmente com as células EGRF-CAR-NK-92 e subsequentemente tratadas com o oalphaherpesvírus humano 1 . Essa combinação demonstrou-se mais eficaz na redução do crescimento do tumor do que os controles de terapia única e resultou em aumento

significativo da sobrevida nos camundongos (CHEN et al, 2016; O'BRYAN e MATHIS, 2018).

No geral, a tendência observada com experimentos utilizando adenovírus oncolíticos foi mimetizada usando alphaherpesvírus humano 1 oncolíticos, sugerindo que as abordagens combinadas são capazes de potencializar os resultados em relação as abordagens de terapia única. Devido à recente aprovação pelo FDA de Imlygic (talimogene laherparepvec ou T-VEC) como um alphaherpesvírus humano 1 oncolíticos para o tratamento clínico do melanoma (AMGEN, 2015), o avanço do alphaherpesvírus humano 1 oncolíticos na clínica para o tratamento do câncer de mama é uma realidade emergente (O'BRYAN e MATHIS, 2018).

## 5.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tumor de mama é a principal causa de morte por câncer em mulheres e apresenta um sério desafio terapêutico em todo o mundo; constituindo a neoplasia maligna mais cara de se tratar. Sendo assim, o câncer mamário impõe um fardo aos pacientes e suas famílias, bem como aos sistemas de saúde em todo o mundo.

Além disso, os tratamentos tradicionais, como a radioterapia e quimioterapia acarretam efeitos colaterais indesejados e no desenvolvimento de quimiorresistência a medicamentos. Adicionalmente, a mastectomia parcial ou total da mama, provoca distúrbios na identidade feminina e no organismo como um todo.

Ainda sim, nenhum dos tratamentos mencionados demonstra eficácia contra as metástases mamárias e, portanto não garante a cura da doença sendo possível a reincidência a partir das células metastáticas. Diante desse cenário, terapias antitumorais que se utilizam de mecanismos inovadores no tratamento do câncer de mama, acima de tudo, no controle das células metastáticas do tumor mamário, são de grande utilidade.

Nesse contexto, a viroterapia oncolítica tem sido proposta como uma terapêutica promissora no tratamento do câncer de mama. Suas atividades antitumorais são induzidas por diferentes mecanismos, incluindo replicação seletiva e subsequente lise das células cancerígenas; geração de proteínas citotóxicas contra células tumorais; inserção de genes terapêuticos no genoma viral; sensibilização de células neoplásicas a processos de quimio/radioterapia; modulação de vias apoptóticas e indução de respostas imunes antitumorais hospedeiras potentes. Vários ensaios clínicos confirmaram a segurança viral com vários vírus diferentes, incluindo o alphaherpesvírus humano 1.

O alphaherpesvírus humano 1 possui um alto potencial terapêutico no combate ao câncer de mama, pois dentre outras características: pode ser administrado repetidamente, com ausência de mielossupressão e acúmulo de toxicidade; pode funcionar sinergicamente com a imunoterapia; o “armeio” do alphaherpesvírus humano 1 oncolítico com transgenes leva ao desenvolvimento de uma variedade de alphaherpesvírus humano 1 oncolíticos com funções antitumorais específicas, o que resulta no aumento da eficácia anticâncer, que por sua vez acarreta o desenvolvimento de uma série de alphaherpesvírus humano 1 oncolíticos

adequados para diversos tipos de tumores, inclusive o de mama, e diferentes rotas de administração.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A CURRIER, Mark et al. Efficacy and Safety of the Oncolytic Herpes Simplex Virus rRp450 Alone and Combined With Cyclophosphamide. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 16, n. 5, p.879-885, maio 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2008.49>.

AGHI, M et al. Multimodal cancer treatment mediated by a replicating oncolytic virus that delivers the oxazaphosphorine/rat cytochrome P450 2B1 and ganciclovir/herpes simplex virus thymidine kinase gene therapies. **Cancer Res. Si**, v. 16, n. 59, p. 3861-3865, 15 ago 1999.

AGHI, M et al. Oncolytic herpes virus with defective ICP6 specifically replicates in quiescent cells with homozygous genetic mutations in p16. **Oncogene**, [s.l.], v. 27, n. 30, p.4249-4254, 17 mar. 2008. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2008.53>.

AGHI, Manish et al. Synergistic Anticancer Effects of Ganciclovir/Thymidine Kinase and 5-Fluorocytosine/Cytosine Deaminase Gene Therapies. **Jnci: Journal of the National Cancer Institute**, [s.l.], v. 90, n. 5, p.370-380, 4 mar. 1998. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/90.5.370>.

ALVAREZ-BRECKENRIDGE, Christopher; KAUR, Balveen; CHIOCCA, E. Antonio. Pharmacologic and Chemical Adjuvants in Tumor Virotherapy. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 109, n. 7, p.3125-3140, 8 jul. 2009. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/cr900048k>.

American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-14-2213>.

Amgen. FDA approves IMLYGIC™ (Talimogene Laherparepvec) as first oncolytic viral therapy in the US. [online] 2018 [cited October 27, 2015]. Available at: <https://www.amgen.com/media/newsreleases/2015/10/fda-approves-imlygic-talimogene-laherparepvecas-first-oncolytic-viral-therapy-in-the-us/>

ANDERSON, D. E. Familial versus Sporadic Breast Cancer. **Cancer**, v. 70, n. 6, p. 1740-46, 1992. Suppl. 25.

ANDERSON, R. A. et al. The effects of chemotherapy and long-term gonadotrophin suppression on the ovarian reserve in premenopausal women with breast cancer. **Human**

**Reproduction**, [s.l.], v. 21, n. 10, p.2583-2592, 4 jul. 2006. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/del201>.

ANDREANSKY, S et al. Evaluation of genetically engineered herpes simplex viruses as oncolytic agents for human malignant brain tumors. **Cancer Res**; [s.l.], v. 8, n. 57, p. 1502-1509, 15 abr 1997.

ANDREANSKY, S et al. Treatment of intracranial gliomas in immunocompetent mice using herpes simplex viruses that express murine interleukins. **Gene Therapy**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.121-130, jan. 1998. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.gt.3300550>.

ANDTBACKA, Robert H.i. et al. Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. **Journal Of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 33, n. 25, p.2780-2788, set. 2015. American Society of Clinical Oncology (ASCO). <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2014.58.3377>.

ARAÚJO, Maria do Socorro Bezerra Queiroz de. O câncer de mama: Uma revisão de literatura. **Rebes Revista Brasileira de Educação e Saúde: GVAA - GRUPO VERDE DE AGROECOLOGIA E ABELHAS - POMBAL - PB**. Pombal, p. 18-27. jun. 2013.

ASADA, Teruo. Treatment of human cancer with mumps virus. **Cancer**, [s.l.], v. 34, n. 6, p.1907-1928, dez. 1974. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1002/1097-0142\(197412\)34:63.0.co;2-4](http://dx.doi.org/10.1002/1097-0142(197412)34:63.0.co;2-4).

AU, Gough G. et al. Oncolytic Coxsackievirus A21 as a novel therapy for multiple myeloma. **British Journal Of Haematology**, [s.l.], v. 137, n. 2, p.133-141, abr. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06550.x>.

AZIM, H. A. et al. Long-term toxic effects of adjuvant chemotherapy in breast cancer. **Annals Of Oncology**, [s.l.], v. 22, n. 9, p.1939-1947, 2 fev. 2011. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdq683>.

BARRY, Mitchel; HO, Alice; MORROW, Monica. The Evolving Role of Partial Breast Irradiation in Early-Stage Breast Cancer. **Annals Of Surgical Oncology**, [s.l.], v. 20, n. 8,



p.2534-2540, 6 mar. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1245/s10434-013-2923-8>.

BAZAN-PEREGRINO, M et al. Combining virotherapy and angiotherapy for the treatment of breast cancer. **Cancer Gene Therapy**, [s.l.], v. 20, n. 8, p.461-468, 12 jul. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/cgt.2013.41>.

BENENCIA, Fabian et al. Oncolytic HSV Exerts Direct Antiangiogenic Activity in Ovarian Carcinoma. **Human Gene Therapy**, [s.l.], v. 16, n. 6, p.765-778, jun. 2005. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/hum.2005.16.765>.

BENNETT, Joseph J et al. Comparison of safety, delivery, and efficacy of two oncolytic herpes viruses (G207 and NV1020) for peritoneal cancer. **Cancer Gene Therapy**, [s.l.], v. 9, n. 11, p.935-945, 18 out. 2002. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cgt.7700510>.

BENNETT, Joseph J. et al. Interleukin 12 Secretion Enhances Antitumor Efficacy of Oncolytic Herpes Simplex Viral Therapy for Colorectal Cancer. **Annals Of Surgery**, [s.l.], v. 233, n. 6, p.819-826, jun. 2001. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/00000658-200106000-00012>.

BIERMAN, Howard R. et al. Remissions in leukemia of childhood following acute infectious disease. Staphylococcus and streptococcus, varicella, and feline panleukopenias. **Cancer**, [s.l.], v. 6, n. 3, p.591-605, maio 1953. Wiley.

BILBAO, R et al. A blood–tumor barrier limits gene transfer to experimental liver cancer: the effect of vasoactive compounds. **Gene Therapy**, [s.l.], v. 7, n. 21, p.1824-1832, nov. 2000. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.gt.3301312>.

BIRD, B. R.j. H.; SWAIN, S. M.. Cardiac Toxicity in Breast Cancer Survivors: Review of Potential Cardiac Problems. **Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.14-24, 1 jan. 2008. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-07-1033>.

BLUM, Joanne L. et al. Anthracyclines in Early Breast Cancer: The ABC Trials—USOR 06-090, NSABP B-46-I/USOR 07132, and NSABP B-49 (NRG Oncology). **Journal Of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 35, n. 23, p.2647-2655, 10 ago. 2017. American Society of Clinical Oncology (ASCO). <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2016.71.4147>.

BOURGEOIS-DAIGNEAULT, Marie-claude et al. Combination of Paclitaxel and MG1 oncolytic virus as a successful strategy for breast cancer treatment. **Breast Cancer Research**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.1-10, 8 ago. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13058-016-0744-y>.

BOVIATSI, EJ et al. Antitumor activity and reporter gene transfer into rat brain neoplasms inoculated with herpes simplex virus vectors defective in thymidine kinase or ribonucleotide reductase. **Gene Ther.** [s.l.], v. 5, n.1, p. 323-331, set 1994.

BOVIATSI, EJ et al. Long- term survival of rats harboring brain neoplasms treated with ganciclovir and a herpes simplex virus vector that retains an intact thymidine kinase gene. **Cancer Res.** [s.l.], v. 22, n. 54, p. 5745– 5751, 15 nov 1994.

BRAMANTE, Simona et al. Oncolytic virotherapy for treatment of breast cancer, including triple-negative breast cancer. **Oncoimmunology**, [s.l.], v. 5, n. 2, e1078057, 27 ago. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/2162402x.2015.1078057>.

BRANDWIJK, Ricardo J.m.g.e.; GRIFFIOEN, Arjan W.; THIJSEN, Victor L.j.l.. Targeted gene-delivery strategies for angiostatic cancer treatment. **Trends In Molecular Medicine**, [s.l.], v. 13, n. 5, p.200-209, maio 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2007.03.001>.

Breast Cancer. National Comprehensive Cancer Network: National Clinical Practice Guidelines in Oncology. Version 3. 2018. [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/breast.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast.pdf).

BULLER, R. M. L. et al. Decreased virulence of recombinant vaccinia virus expression vectors is associated with a thymidine kinase-negative phenotype. **Nature**, [s.l.], v. 317, n. 6040, p.813-815, out. 1985. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/317813a0>.

BURRELL, Christopher J.; HOWARD, Colin R.; MURPHY, Frederick A.. Herpesviruses. **Fenner And White's Medical Virology**, [s.l.], p.237-261, 2017. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-375156-0.00017-5>.

CAMERON, J. M. et al. Ribonucleotide Reductase Encoded by Herpes Simplex Virus Is a Determinant of the Pathogenicity of the Virus in Mice and a Valid Antiviral Target. **Journal Of General Virology**, [s.l.], v. 69, n. 10, p.2607-2612, 1 out. 1988. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-69-10-2607>.

CAREW, John F. et al. Selective Infection and Cytolysis of Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma with Sparing of Normal Mucosa by a Cytotoxic Herpes Simplex Virus Type 1 (G207). **Human Gene Therapy**, [s.l.], v. 10, n. 10, p.1599-1606, jul. 1999. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/10430349950017608>.

CARROLL, Nancy M. et al. Enhancement of Gene Therapy Specificity for Diffuse Colon Carcinoma Liver Metastases with Recombinant Herpes Simplex Virus. **Annals Of Surgery**, [s.l.], v. 224, n. 3, p.323-330, set. 1996. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/00000658-199609000-00008>.

CARROLL, Nancy M. et al. The Effect of Ganciclovir on Herpes Simplex Virus-Mediated Oncolysis. **Journal Of Surgical Research**, [s.l.], v. 69, n. 2, p.413-417, maio 1997. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/jsre.1997.5089>.

CASSADY KA, GROSS M, ROIZMAN B. The second-site mutation in the herpes simplex virus recombinants lacking the gamma134.5 genes precludes shutoff of protein synthesis by blocking the phosphorylation of eIF-2alpha. **J Virol**. [s.l.], v. 9, n. 72, p. 7005-7011, set 1998.

CHAMBERS, R. et al. Comparison of genetically engineered herpes simplex viruses for the treatment of brain tumors in a scid mouse model of human malignant glioma. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 92, n. 5, p.1411-1415, 28 fev. 1995. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.92.5.1411>.

CHEN, N.G.; SZALAY, A.A. **Oncolytic virotherapy of cancer. In Cancer Management in Man: Chemotherapy, Biological Therapy, Hyperthermia and Supporting Measures;** Minev, B.R., Ed.; Springer: Houten, The Netherlands, 2011; Volume 13.

CHEN, Xilin et al. A combinational therapy of EGFR-CAR NK cells and oncolytic herpes simplex virus 1 for breast cancer brain metastases. **Oncotarget**, [s.l.], v. 7, n. 19, p.27764-27777, 1 abr. 2016. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.8526>.

CHENG, Lin et al. A novel oncolytic herpes simplex virus armed with the carboxyl-terminus of murine MyD116 has enhanced anti-tumour efficacy against human breast cancer cells. **Oncology Letters**, [s.l.], v. 5, n. 15, p.7046-7052, 13 mar. 2018. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/ol.2018.8247>.

CHOU, J et al. Mapping of herpes simplex virus-1 neurovirulence to gamma 134.5, a gene nonessential for growth in culture. **Science**, [s.l.], v. 250, n. 4985, p.1262-1266, 30 nov. 1990.

American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.2173860>.

CLEMENS, Michael J. Targets and mechanisms for the regulation of translation in malignant transformation. **Oncogene**, [s.l.], v. 23, n. 18, p.3180-3188, abr. 2004. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1207544>.

COATES, A. S. et al. Tailoring therapies—improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. **Annals Of Oncology**, [s.l.], v. 26, n. 8, p.1533-1546, 4 maio 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdv221>.

COBLEIGH, Melody A. et al. Multinational Study of the Efficacy and Safety of Humanized Anti-HER2 Monoclonal Antibody in Women Who Have HER2-Overexpressing Metastatic Breast Cancer That Has Progressed After Chemotherapy for Metastatic Disease. **Journal Of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 17, n. 9, p.2639-2639, set. 1999. American Society of Clinical Oncology (ASCO). <http://dx.doi.org/10.1200/jco.1999.17.9.2639>.

CODY, James J.; MARKERT, James M.; HURST, Douglas R.. Histone Deacetylase Inhibitors Improve the Replication of Oncolytic Herpes Simplex Virus in Breast Cancer Cells. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 3, e92919, 20 mar. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0092919>.

COFFEY, M. C.. Reovirus Therapy of Tumors with Activated Ras Pathway. **Science**, [s.l.], v. 282, n. 5392, p.1332-1334, 13 nov. 1998. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.282.5392.1332>.

COFFIN, Robert. Interview with Robert Coffin, inventor of T-VEC: the first oncolytic immunotherapy approved for the treatment of cancer. **Immunotherapy**, [s.l.], v. 8, n. 2, p.103-106, fev. 2016. Future Medicine Ltd. <http://dx.doi.org/10.2217/imt.15.116>.

COZZI, Paul J. et al. Oncolytic viral gene therapy for prostate cancer using two attenuated, replication-competent, genetically engineered herpes simplex viruses. **The Prostate**, [s.l.], v. 53, n. 2, p.95-100, 19 set. 2002. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/pros.10138>.

CRIMI, Salvatore et al. Herpes Virus, Oral Clinical Signs and QoL: Systematic Review of Recent Data. **Viruses**, [s.l.], v. 11, n. 5, p.463-481, 21 maio 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v11050463>.

CROYLE, M. A. et al. PEGylation of a Vesicular Stomatitis Virus G Pseudotyped Lentivirus Vector Prevents Inactivation in Serum. **Journal Of Virology**, [s.l.], v. 78, n. 2, p.912-921, 23 dez. 2003. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.78.2.912-921.2004>

DAI, M.h. et al. Oncolytic vaccinia virus in combination with radiation shows synergistic antitumor efficacy in pancreatic cancer. **Cancer Letters**, [s.l.], v. 344, n. 2, p.282-290, mar. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2013.11.007>.

DAMBACH, Megan J. et al. Oncolytic Viruses Derived from the  $\gamma$ 34.5-Deleted Herpes Simplex Virus Recombinant R3616 Encode a Truncated UL3 Protein. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 13, n. 5, p.891-898, maio 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.02.006>.

DAVIES, C et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. **The Lancet**, [s.l.], v. 378, n. 9793, p.771-784, ago. 2011. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(11\)60993-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(11)60993-8).

DEGUCHI, Tomohiro et al. Combination of the Tumor Angiogenesis Inhibitor Bevacizumab and Intratumoral Oncolytic Herpes Virus Injections as a Treatment Strategy for Human Gastric Cancers. **Hepatogastroenterology**, [s.l.], v. 59, n. 118, p.1844-1850, 14 dez. 2011. Update Medical Publishing. <http://dx.doi.org/10.5754/hge11566>.

DENKERT, Carsten et al. Molecular alterations in triple-negative breast cancer—the road to new treatment strategies. **The Lancet**, [s.l.], v. 389, n. 10087, p.2430-2442, jun. 2017. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)32454-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(16)32454-0).

DIABY, Vakaramoko et al. A review of systematic reviews of the cost-effectiveness of hormone therapy, chemotherapy, and targeted therapy for breast cancer. **Breast Cancer Research And Treatment**, [s.l.], v. 151, n. 1, p.27-40, 19 abr. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-015-3383-6>.

Dillon D, Guidi AJ, Schnitt SJ. Pathology of invasive breast cancer. In: Harris JR, Lippman ME, MorrowM, Osborne CK, eds. *Diseases of the Breast*. 5th ed. Philadelphia, PA:Wolters Kluwer Health; 2014.

DOCK, G. The influence of complicating diseases on leukemia. **The American Journal of the Medical Sciences**, [s.l.], v. 127, p.563–592, abril, 1904.

DORONIN, K. et al. Tumor-Specific, Replication-Competent Adenovirus Vectors Overexpressing the Adenovirus Death Protein. **Journal Of Virology**, [s.l.], v. 74, n. 13, p.6147-6155, 1 jul. 2000. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.74.13.6147-6155.2000>.

DUFLOTH, Rozany Mucha et al. Analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in Brazilian breast cancer patients with positive family history. **Sao Paulo Medical Journal**, [s.l.], v. 123, n. 4, p.192-197, 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-31802005000400007>.

DUNCAN, Ruth. Polymer conjugates as anticancer nanomedicines. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 6, n. 9, p.688-701, 10 ago. 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1958>.

DWYER, Roisin M et al. Advances in mesenchymal stem cell-mediated gene therapy for cancer. **Stem Cell Research & Therapy**, [s.l.], v. 1, n. 3, p.25-32, 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/scrt25>.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Aromatase inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer: patient-level meta-analysis of the randomised trials. **The Lancet**, [s.l.], v. 386, n. 10001, p.1341-1352, out. 2015. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(15\)61074-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(15)61074-1).

EASTO N, D. F.; FORD , D.; BISHOP, D. T. Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. **American Journal of Human Genetics**, v. 56, n. 1, p. 265-271, 1995.

EBERT, O. et al. Syncytia induction enhances the oncolytic potential of vesicular stomatitis virus in virotherapy for cancer. **Cancer Res.**, [s.l.], v. 64, n. 9, p. 3265–3270, mai. 2004.

EBRAHIMI, Safieh et al. Therapeutic potency of oncolytic virotherapy in breast cancer targeting, current status and perspective. **Journal Of Cellular Biochemistry**, [s.l.], v. 120, n. 3, p.2801-2809, 27 set. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.27725>.

EDGE, Robert e et al. A let-7 MicroRNA-sensitive Vesicular Stomatitis Virus Demonstrates Tumor-specific Replication. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 16, n. 8, p.1437-1443, ago. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2008.130>.

EISENBERG, David P. et al. Hyperthermia potentiates oncolytic herpes viral killing of pancreatic cancer through a heat shock protein pathway. **Surgery**, [s.l.], v. 148, n. 2, p.325-334, ago. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.surg.2010.05.005>.

ELDE, Nels C. et al. Protein kinase R reveals an evolutionary model for defeating viral mimicry. **Nature**, [s.l.], v. 457, n. 7228, p.485-489, 30 nov. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature07529>.

EPSTEIN, Alberto et al. HSV-1-Derived Recombinant and Amplicon Vectors for Gene Transfer and Gene Therapy. **Current Gene Therapy**, [s.l.], v. 5, n. 5, p.445-457, 1 out. 2005. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/156652305774329285>.

EPSTEIN, Alberto L. HSV-1-based amplicon vectors: design and applications. **Gene Therapy**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.S154-S158, out. 2005. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.gt.3302617>.

EPSTEIN, Alberto Luis. HSV-1-derived amplicon vectors: recent technological improvements and remaining difficulties - a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 104, n. 3, p.399-410, maio 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762009000300002>.

ERIKSSON, Minna et al. Oncolytic Adenoviruses Kill Breast Cancer Initiating CD44+CD24-/Low Cells. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 15, n. 12, p.2088-2093, dez. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.mt.6300300>.

ETO, Yusuke et al. Development of PEGylated adenovirus vector with targeting ligand. **International Journal Of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 354, n. 1-2, p.3-8, abr. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.08.025>.

FAN, Jingjing et al. The oncolytic herpes simplex virus vector, G47 $\Delta$ , effectively targets tamoxifen-resistant breast cancer cells. **Oncology Reports**, [s.l.], v. 35, n. 3, p.1741-1749, 30 dez. 2015. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/or.2015.4539>.

FANG, Lin et al. An oncolytic adenovirus expressing interleukin-24 enhances antitumor activities in combination with paclitaxel in breast cancer cells. **Molecular Medicine Reports**, [s.l.], v. 8, n. 5, p.1416-1424, 13 set. 2013. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2013.1680>.

FARIA, Déborah Behr de. **UTILIZAÇÃO DE POXVÍRUS ONCOLÍTICOS COMO FERRAMENTA TERAPÊUTICA CONTRA O CANCER**. 2010. 32 f. Monografia (Especialização) - Curso de Especialização em Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

FISHER, Bernard et al. Twenty-Year Follow-up of a Randomized Trial Comparing Total Mastectomy, Lumpectomy, and Lumpectomy plus Irradiation for the Treatment of Invasive Breast Cancer. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 347, n. 16, p.1233-1241, 17 out. 2002. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa022152>.

FISHER, Kerry D.; SEYMOUR, Leonard W.. HEMA copolymers for masking and retargeting of therapeutic viruses☆. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 62, n. 2, p.240-245, 17 fev. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2009.12.003>.

FOLOPPE, J et al. Targeted delivery of a suicide gene to human colorectal tumors by a conditionally replicating vaccinia virus. **Gene Therapy**, [s.l.], v. 15, n. 20, p.1361-1371, 15 maio 2008. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/gt.2008.82>.

FOULKES, William D.; SMITH, Ian E.; REIS-FILHO, Jorge S.. Triple-Negative Breast Cancer. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 363, n. 20, p.1938-1948, 11 nov. 2010. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmra1001389>.

FRENKEL N, SINGER O, KWONG AD. Minireview: the herpes simplex virus amplicon—a versatile defective virus vector. **Gene Ther. Si**, p. S40-6. 1994.

FREYTAG, Svend O. et al. A Novel Three-Pronged Approach to Kill Cancer Cells Selectively: Concomitant Viral, Double Suicide Gene, and Radiotherapy. **Human Gene Therapy**, [s.l.], v. 9, n. 9, p.1323-1333, 10 jun. 1998. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/hum.1998.9.9-1323>.

FREYTAG, Svend O. et al. Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double-suicide gene therapy in combination with conventional-dose three-dimensional conformal radiation therapy for the treatment of newly diagnosed, intermediate- to high-risk prostate cancer. **Cancer Res**, [s.l.], v. 63, n. 21, p. 7497–7506, 1 nov. 2003.



FREYTAG, Syend O. et al. Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double suicide gene therapy for the treatment of locally recurrent prostate cancer. **Cancer Res**, [s.l.], v. 62, n. 17, p. 4968–4976, 1 set. 2002.

FUCKAR, Dora et al. VEGF Expression is Associated with Negative Estrogen Receptor Status in Patients with Breast Cancer. **International Journal Of Surgical Pathology**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.49-55, jan. 2006. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/106689690601400109>.

FUEYO, Juan et al. A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. **Oncogene**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.2-12, jan. 2000. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1203251>.

FUKUHARA, H.. Oncolytic Herpes Simplex Virus Vector G47 in Combination with Androgen Ablation for the Treatment of Human Prostate Adenocarcinoma. **Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 11, n. 21, p.7886-7890, 1 nov. 2005. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-05-1090>.

GALANIS, Evanthia et al. Oncolytic Measles Virus Expressing the Sodium Iodide Symporter to Treat Drug-Resistant Ovarian Cancer. **Cancer Research**, [s.l.], v. 75, n. 1, p.22-30, 14 nov. 2014. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-14-2533>.

GANESH, S. et al. Intratumoral Coadministration of Hyaluronidase Enzyme and Oncolytic Adenoviruses Enhances Virus Potency in Metastatic Tumor Models. **Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 14, n. 12, p.3933-3941, 15 jun. 2008. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-07-4732>.

GARBER, Ken. China Approves World's First Oncolytic Virus Therapy For Cancer Treatment. **Jnci: Journal of the National Cancer Institute**, [s.l.], v. 98, n. 5, p.298-300, 1 mar. 2006. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djj111>.

GARCÍA-CASTRO, J et al. Treatment of metastatic neuroblastoma with systemic oncolytic virotherapy delivered by autologous mesenchymal stem cells: an exploratory study. **Cancer Gene Therapy**, [s.l.], v. 17, n. 7, p.476-483, 19 fev. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/cgt.2010.4>.

GEORGIADES, J et al. Research on the oncolytic effect of APC viruses in cancer of the cervix uteri; preliminary report. **Biuletyn Instytutu Medycyny Morskiej W Gdansk**. Si, p. 49-57. jan. 1959.

GHEBEH, H. et al. Doxorubicin downregulates cell surface B7-H1 expression and upregulates its nuclear expression in breast cancer cells: Role of B7-H1 as an anti-apoptotic molecule. **Breast Cancer Res.**, [s.l.], v. 12, n. 4, 13 jul. 2010.

GHONCHEH, Mahshid; POURNAMDAR, Zahra; SALEHINIYA, Hamid. Incidence and Mortality and Epidemiology of Breast Cancer in the World. **Asian Pacific Journal Of Cancer Prevention**, [s.l.], v. 17, n. 3, p.43-46, 1 jun. 2016. Asian Pacific Organization for Cancer Prevention. <http://dx.doi.org/10.7314/apjcp.2016.17.s3.43>.

GIULIANO, Armando E. et al. Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, [s.l.], v. 67, n. 4, p.290-303, 14 mar. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21393>.

GODOY, A. B. M. Assistência do enfermeiro diante das dificuldades apresentadas por mulheres mastectomizadas. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, ano VII, n. 20, p. 46-51, abr/jun 2009.

GOLD LI. The role for transforming growth factor-beta (TGFbeta) in human cancer. **Crit Rev Oncog**. Si, p. 303-360. 1999.

GOLDSMITH, Kim et al. Infected Cell Protein (ICP)47 Enhances Herpes Simplex Virus Neurovirulence by Blocking the CD8+ T Cell Response. **The Journal Of Experimental Medicine**, [s.l.], v. 187, n. 3, p.341-348, 2 fev. 1998. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.187.3.341>.

GOLDSTEIN DJ, WELLER SK. Herpes simplex virus type 1-induced ribonucleotide reductase activity is dispensible for virus growth andDNAsynthesis: isolation and characterization of an ICP6 lacZ insertion mutant. **J Virol**. [s.l.], v. 1, n. 62, p. 196-205, jan 1988.

GOMES, E. M. et al. Antitumor Activity of an Oncolytic Adenoviral-CD40 Ligand (CD154) Transgene Construct in Human Breast Cancer Cells. **Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 15, n. 4, p.1317-1325, 15 fev. 2009. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-08-1360>.

GONZALEZ-ANGULO A, MORALES-VASQUEZ F, HORTOBAGYI GN. Advances in experimental medicine and biology. **Adv Exp Med Biol**. Si, p. 1-22. 2007.

GOPISANKAR, Mohanan Geetha; SURENDIRAN, A.. Oncolytic virotherapy – A novel strategy for cancer therapy. **Egyptian Journal Of Medical Human Genetics**, [s.l.], v. 19, n. 3, p.165-169, jul. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmhg.2017.10.006>.

GUEDAN, Sonia et al. Hyaluronidase Expression by an Oncolytic Adenovirus Enhances Its Intratumoral Spread and Suppresses Tumor Growth. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 18, n. 7, p.1275-1283, jul. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2010.79>.

HAMMOND ME, HAYES DF, DOWSETT M, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. **J Clin Oncol**, [s.l.], v. 28, n. 16, p. 2784-2795, jul. 2010. doi:10.1200/JCO.2009.25. 6529

HAMMOND, A. L. et al. Single-Chain Antibody Displayed on a Recombinant Measles Virus Confers Entry through the Tumor-Associated Carcinoembryonic Antigen. **Journal Of Virology**, [s.l.], v. 75, n. 5, p.2087-2096, 1 mar. 2001. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.75.5.2087-2096.2001>.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert a.. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, [s.l.], v. 144, n. 5, p.646-674, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

HARBECK, Nadia; GNANT, Michael. Breast cancer. **Lancet**. [s.l.], p. 1334-1350. mar. 2017

HASTIE, E.; GRDZELISHVILI, V. Z.. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. **Journal Of General Virology**, [s.l.], v. 93, n. 12, p.2529-2545, 10 out. 2012. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.046672-0>.

HAVILAND, Joanne S et al. The UK Standardisation of Breast Radiotherapy (START) trials of radiotherapy hypofractionation for treatment of early breast cancer: 10-year follow-up results of two randomised controlled trials. **The Lancet Oncology**, [s.l.], v. 14, n. 11, p.1086-1094, out. 2013. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045\(13\)70386-3](http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045(13)70386-3).

HEISE, Carla et al. An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. **Nature Medicine**, [s.l.], v. 6, n. 10, p.1134-1139, out. 2000. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/80474>.

HEISE, Carla et al. ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. **Nature Medicine**, [s.l.], v. 3, n. 6, p.639-645, jun. 1997. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nm0697-639>.

HENGSTSCHLAGER, M. et al. Different regulation of thymidine kinase during the cell cycle of normal versus DNA tumor virus-transformed cells. **J. Biol. Chem**, [s.l.], v. 269, n. 19, p. 13836–13842, maio 1994.

HIRVINEN, Mari et al. Immunological Effects of a Tumor Necrosis Factor Alpha–Armed Oncolytic Adenovirus. **Human Gene Therapy**, [s.l.], v. 26, n. 3, p.134-144, mar. 2015. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/hum.2014.069>.

HOSTER, Ha; ZANES, Rp Jr; VON HAAM, e. Studies in Hodgkin's syndrome; the association of viral hepatitis and Hodgkin's disease; a preliminary report. **Cancer Res. Si**, p. 473-480. ago. 1949.

HU JC, COFFIN RS. Oncolytic herpes simplex virus for tumor therapy. **Int Rev Neurobiol** [s.l.], p. 165-84. 2003.

HU, J. C.c. et al. A Phase I Study of OncoVEXGM-CSF, a Second-Generation Oncolytic Herpes Simplex Virus Expressing Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor. **Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 12, n. 22, p.6737-6747, 15 nov. 2006. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-06-0759>.

HU, Zebin et al. Systemic Delivery of an Oncolytic Adenovirus Expressing Soluble Transforming Growth Factor- $\beta$  Receptor II–Fc Fusion Protein Can Inhibit Breast Cancer

Bone Metastasis in a Mouse Model. **Human Gene Therapy**, [s.l.], v. 21, n. 11, p.1623-1629, nov. 2010. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/hum.2010.018>.

HUANG, Tiffany T. et al. Intravenous Administration of Retroviral Replicating Vector, Toca 511, Demonstrates Therapeutic Efficacy in Orthotopic Immune-Competent Mouse Glioma Model. **Human Gene Therapy**, [s.l.], v. 26, n. 2, p.82-93, fev. 2015. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/hum.2014.100>.

HUGHES, Kevin S. et al. Lumpectomy Plus Tamoxifen With or Without Irradiation in Women Age 70 Years or Older With Early Breast Cancer: Long-Term Follow-Up of CALGB 9343. **Journal Of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 31, n. 19, p.2382-2387, jul. 2013. American Society of Clinical Oncology (ASCO). <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2012.45.2615>.

HURST, Douglas; CODY, James. Promising oncolytic agents for metastatic breast cancer treatment. **Oncolytic Virotherapy**, [s.l.], v. 4, p.63-73, jun. 2015. Dove Medical Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2147/ov.s63045>.

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses, 2018. **Genus: Simplexvirus**. Disponível em: [https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode\\_id=201851428](https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=201851428)> Acesso em: 15 de outubro de 2019.

ILETT, e J et al. Dendritic cells and T cells deliver oncolytic reovirus for tumour killing despite pre-existing anti-viral immunity. **Gene Therapy**, [s.l.], v. 16, n. 5, p.689-699, 12 mar. 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/gt.2009.29>.

ILETT, E. J. et al. Internalization of Oncolytic Reovirus by Human Dendritic Cell Carriers Protects the Virus from Neutralization. **Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 17, n. 9, p.2767-2776, 9 mar. 2011. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-10-3266>.

INGEMARSDOTTER, C K et al. Low-dose paclitaxel synergizes with oncolytic adenoviruses via mitotic slippage and apoptosis in ovarian cancer. **Oncogene**, [s.l.], v. 29, n. 45, p.6051-6063, 23 ago. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2010.335>.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **A situação do câncer de mama no Brasil: síntese de dados dos sistemas de informação**. Rio de Janeiro, 2019. 85 p.

Instituto Nacional de Câncer. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Educação. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. 5. ed. Rio de Janeiro: Inca, 2019.

ISRAYELYAN, Anna et al. Herpes simplex virus type-1 (HSV-1) oncolytic and highly fusogenic mutants carrying the NV1020 genomic deletion effectively inhibit primary and metastatic tumors in mice. **Virology Journal**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.68-78, 2008. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422x-5-68>.

ISRAYELYAN, Anna et al. Thalidomide suppressed the growth of 4T1 cells into solid tumors in Balb/c mice in a combination therapy with the oncolytic fusogenic HSV 1 OncdSyn. **Cancer Chemotherapy And Pharmacology**, [s.l.], v. 64, n. 6, p.1201-1210, 24 mar. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00280-009-0987-8>.

ISRAYELYAN, Anna H. et al. Effective Treatment of Human Breast Tumor in a Mouse Xenograft Model with Herpes Simplex Virus Type 1 Specifying the NV1020 Genomic Deletion and the gBsyn3 Syncytial Mutation Enabling High Viral Replication and Spread in Breast Cancer Cells. **Human Gene Therapy**, [s.l.], v. 18, n. 5, p.457-473, maio 2007. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/hum.2006.145>.

IVANOVIĆ, Vesna et al. Elevated plasma levels of transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) in patients with advanced breast cancer: association with disease progression. **European Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 39, n. 4, p.454-461, mar. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0959-8049\(02\)00502-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0959-8049(02)00502-6).

JARNAGIN, W R et al. Neoadjuvant treatment of hepatic malignancy: an oncolytic herpes simplex virus expressing IL-12 effectively treats the parent tumor and protects against recurrence-after resection. **Cancer Gene Therapy**, [s.l.], v. 10, n. 3, p.215-223, mar. 2003. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cgt.7700558>.

JAY, Chris et al. MiRNA Profiling for Diagnosis and Prognosis of Human Cancer. **Dna And Cell Biology**, [s.l.], v. 26, n. 5, p.293-300, maio 2007. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/dna.2006.0554>.

JEYARETNA, Deva S.; RABKIN, Samuel D.; MARTUZA, Robert L.. Oncolytic herpes simplex virus therapy for peripheral nerve tumors. **Neurosurgical Focus**, [s.l.], v. 22, n. 6, p.1-6, jun. 2007. Journal of Neurosurgery Publishing Group (JNSPG). <http://dx.doi.org/10.3171/foc.2007.22.6.5>.

JIA, W. W.-g. et al. Selective Destruction of Gliomas in Immunocompetent Rats by Thymidine Kinase-Defective Herpes Simplex Virus Type 1. **Jnci Journal Of The National Cancer Institute**, [s.l.], v. 86, n. 16, p.1209-1215, 17 ago. 1994. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/86.16.1209>.

JONES, Stephen E. et al. Phase III Trial Comparing Doxorubicin Plus Cyclophosphamide With Docetaxel Plus Cyclophosphamide As Adjuvant Therapy for Operable Breast Cancer. **Journal Of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 24, n. 34, p.5381-5387, dez. 2006. American Society of Clinical Oncology (ASCO). <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2006.06.5391>.

JOSHI, Himanshu; PRESS, Michael F.. Molecular Oncology of Breast Cancer. **The Breast**, [s.l.], p.282-307, 2018. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-323-35955-9.00022-2>.

KANENO, Ramon et al. Chemotherapeutic agents in low noncytotoxic concentrations increase immunogenicity of human colon cancer cells. **Cellular Oncology**, [s.l.], v. 34, n. 2, p.97-106, 20 jan. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13402-010-0005-5>.

KAUFMAN, Howard et al. Oncolytic virus therapy for cancer. **Oncolytic Virotherapy**, [s.l.], p.31-47, set. 2013. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/ov.s38901>.

KAUFMAN, Howard L. et al. Local and Distant Immunity Induced by Intralesional Vaccination with an Oncolytic Herpes Virus Encoding GM-CSF in Patients with Stage IIIc and IV Melanoma. **Annals Of Surgical Oncology**, [s.l.], v. 17, n. 3, p.718-730, 14 nov. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1245/s10434-009-0809-6>.

KAUFMAN, Howard L.; KOHLHAPP, Frederick J.; ZLOZA, Andrew. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.], v. 14, n. 9, p.642-662, set. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd4663>.

KEMBALL, Christopher C; ALIREZAEI, Mehrdad; WHITTON, J Lindsay. Type B coxsackieviruses and their interactions with the innate and adaptive immune systems. **Future Microbiology**, [s.l.], v. 5, n. 9, p.1329-1347, set. 2010. Future Medicine Ltd. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.10.101>.

KHURI, Fadlo R. et al. A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. **Nature Medicine**, [s.l.], v. 6, n. 8, p.879-885, ago. 2000. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/78638>.

KIMATA, Hideto et al. Pilot Study of Oncolytic Viral Therapy Using Mutant Herpes Simplex Virus (HF10) Against Recurrent Metastatic Breast Cancer. **Annals Of Surgical Oncology**, [s.l.], v. 13, n. 8, p.1078-1084, 24 jul. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1245/aso.2006.08.035>.

KOUBY, David A. et al. Oncolytic viral therapy for human colorectal cancer and liver metastases using a multi-mutated herpes simplex virus type-1 (G207). **The FASEB Journal**, [s.l.], v. 13, n. 11, p.1325-1334, ago. 1999. FASEB. <http://dx.doi.org/10.1096/fasebj.13.11.1325>.

KRAMM, C. M. et al. Therapeutic Efficiency and Safety of a Second-Generation Replication-Conditional HSV 1 Vector for Brain Tumor Gene Therapy. **Human Gene Therapy**, [s.l.], v. 8, n. 17, p.2057-2068, 20 nov. 1997. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/hum.1997.8.17-2057>.

KRAMM, Christof M. et al. Long-Term Survival in a Rodent Model of Disseminated Brain Tumors by Combined Intrathecal Delivery of Herpes Vectors and Ganciclovir Treatment. **Human Gene Therapy**, [s.l.], v. 7, n. 16, p.1989-1994, 20 out. 1996. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/hum.1996.7.16-1989>.



KUMAR, Madhu S et al. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. **Nature Genetics**, [s.l.], v. 39, n. 5, p.673-677, 1 abr. 2007. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/ng2003>.

KUNKLER, Ian H et al. Breast-conserving surgery with or without irradiation in women aged 65 years or older with early breast cancer (PRIME II): a randomised controlled trial. **The Lancet Oncology**, [s.l.], v. 16, n. 3, p.266-273, mar. 2015. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045\(14\)71221-5](http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045(14)71221-5).

KURIHARA, Toshikazu et al. Selectivity of a replication-competent adenovirus for human breast carcinoma cells expressing the MUC1 antigen. **Journal Of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 106, n. 6, p.763-771, 15 set. 2000. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci9180>.

LACHMANN, Robin. Herpes simplex virus-based vectors. **International Journal Of Experimental Pathology**, [s.l.], v. 85, n. 4, p.177-190, 12 ago. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.0959-9673.2004.00383.x>.

LAKHANI, S. R. (ed.) **WHO Classification of Tumours of Breast**. Geneve: International Agency for Research on Cancer, 2012.

LAWLER, Sean E. et al. Oncolytic Viruses in Cancer Treatment. **Jama Oncology**, [s.l.], v. 3, n. 6, p.841-849, 1 jun. 2017. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.2064>.

LEBER, Mathias F et al. MicroRNA-sensitive Oncolytic Measles Viruses for Cancer-specific Vector Tropism. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 19, n. 6, p.1097-1106, jun. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2011.55>.

LEE, Brittany L et al. Breast cancer in Brazil: present status and future goals. **The Lancet Oncology**, [s.l.], v. 13, n. 3, p.95-102, mar. 2012. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045\(11\)70323-0](http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045(11)70323-0).

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**, [s.l.], v. 17, n. 2, p.73-79, 24 jul. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/cgt.2009.50>.

LI, J et al. Treatment of breast cancer stem cells with oncolytic herpes simplex virus. **Cancer Gene Therapy**, [s.l.], v. 19, n. 10, p.707-714, 17 ago. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/cgt.2012.49>.

LI, Qi-xiang; LIU, Guohong; WONG-STAAL, Flossie. Oncolytic virotherapy as a personalized cancer vaccine. **International Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 123, n. 3, p.493-499, 23 maio 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.23692>.

LIAPIS, Helen et al. Expression of  $\alpha v\beta 3$  integrin is less frequent in ovarian epithelial tumors of low malignant potential in contrast to ovarian carcinomas. **Human Pathology**, [s.l.], v. 28, n. 4, p.443-449, abr. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0046-8177\(97\)90033-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0046-8177(97)90033-2).

LICHTY, Brian D. et al. Going viral with cancer immunotherapy. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 14, n. 8, p.559-567, 3 jul. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3770>.

LING, Xiaoyang et al. Mesenchymal Stem Cells Overexpressing IFN- $\beta$  Inhibit Breast Cancer Growth and Metastases through Stat3 Signaling in a Syngeneic Tumor Model. **Cancer Microenvironment**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.83-95, 19 mar. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12307-010-0041-8>.

LIU, B L et al. ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties. **Gene Therapy**, [s.l.], v. 10, n. 4, p.292-303, fev. 2003. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.gt.3301885>.

LIU, Renbin; VARGHESE, Susan; RABKIN, Samuel D.. Oncolytic Herpes Simplex Virus Vector Therapy of Breast Cancer in C3(1)/SV40 T-antigen Transgenic Mice. **Cancer Research**, [s.l.], v. 65, n. 4, p.1532-1540, 15 fev. 2005. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-04-3353>.

LIU, Ta-chiang et al. Oncolytic HSV Armed with Platelet Factor 4, an Antiangiogenic Agent, Shows Enhanced Efficacy. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 14, n. 6, p.789-797, dez. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.07.011>.

LIU, Ta-chiang et al. Trichostatin A and Oncolytic HSV Combination Therapy Shows Enhanced Antitumoral and Antiangiogenic Effects. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 16, n. 6, p.1041-1047, jun. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2008.58>.

LOPEZ, M. V. et al. Tumor associated stromal cells play a critical role on the outcome of the oncolytic efficacy of conditionally replicative adenoviruses. **PLoS ONE**, [s.l.], v. 4, n. 4, p. e5119, abr. 2009.

LOUTEN, Jennifer. Herpesviruses. **Essential Human Virology**, [s.l.], p.235-256, 2016. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-800947-5.00013-2>.

MACKIE, Rona M; STEWART, Barry; BROWN, S Moira. Intralesional injection of herpes simplex virus 1716 in metastatic melanoma. **The Lancet**, [s.l.], v. 357, n. 9255, p.525-526, fev. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(00\)04048-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(00)04048-4).

MADER, E. K. et al. Mesenchymal Stem Cell Carriers Protect Oncolytic Measles Viruses from Antibody Neutralization in an Orthotopic Ovarian Cancer Therapy Model. **Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 15, n. 23, p.7246-7255, 24 nov. 2009. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-09-1292>.

MAKKI, Jaafar. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. **Clinical Medicine Insights: Pathology**, [s.l.], v. 8, p.23-31, jan. 2015. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.4137/cpath.s31563>.

MALUTA, Sergio et al. Intraoperative Electron Radiotherapy (IOERT) as an Alternative to Standard Whole Breast Irradiation: Only for Low-Risk Subgroups?. **Breast Care**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.102-102, 2014. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000362392>.

MANSOUR, M.; PALESE, P.; ZAMARIN, D.. Oncolytic Specificity of Newcastle Disease Virus Is Mediated by Selectivity for Apoptosis-Resistant Cells. **Journal Of Virology**, [s.l.], v. 85, n. 12, p.6015-6023, 6 abr. 2011. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01537-10>.

MARCATO, Paola et al. Oncolytic Reovirus Effectively Targets Breast Cancer Stem Cells. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 17, n. 6, p.972-979, jun. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2009.58>.

MARKERT, J M et al. Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. **Gene Therapy**, [s.l.], v. 7, n. 10, p.867-874, maio 2000. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.gt.3301205>.

MARKERT, James M et al. A Phase 1 Trial of Oncolytic HSV-1, G207, Given in Combination With Radiation for Recurrent GBM Demonstrates Safety and Radiographic Responses. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 22, n. 5, p.1048-1055, maio 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2014.22>.

MARTA, Gustavo Nader et al. Accelerated partial irradiation for breast cancer: Systematic review and meta-analysis of 8653 women in eight randomized trials. **Radiotherapy And Oncology**, [s.l.], v. 114, n. 1, p.42-49, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.radonc.2014.11.014>.

MARTINEZ-QUINTANILLA, Jordi et al. Encapsulated Stem Cells Loaded With Hyaluronidase-expressing Oncolytic Virus for Brain Tumor Therapy. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.108-118, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2014.204>.

MARTUZA, R. et al. Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. **Science**, [s.l.], v. 252, n. 5007, p.854-856, 10 maio 1991. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1851332>.

MCAULIFFE, P et al. Effective treatment of pancreatic tumors with two multimutated herpes simplex oncolytic viruses. **Journal Of Gastrointestinal Surgery**, [s.l.], v. 4, n. 6, p.580-588, dez. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1091-255x\(00\)80106-7](http://dx.doi.org/10.1016/s1091-255x(00)80106-7).

MCKEE, Trevor D. et al. Degradation of Fibrillar Collagen in a Human Melanoma Xenograft Improves the Efficacy of an Oncolytic Herpes Simplex Virus Vector. **Cancer Research**, [s.l.], v. 66, n. 5, p.2509-2513, 1 mar. 2006. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-05-2242>.

MENOTTI, L. et al. Construction of a Fully Retargeted Herpes Simplex Virus 1 Recombinant Capable of Entering Cells Solely via Human Epidermal Growth Factor Receptor 2. **Journal Of Virology**, [s.l.], v. 82, n. 20, p.10153-10161, 6 ago. 2008. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01133-08>.

MENOTTI, L. et al. Inhibition of human tumor growth in mice by an oncolytic herpes simplex virus designed to target solely HER-2-positive cells. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 106, n. 22, p.9039-9044, 20 maio 2009. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0812268106>.

MENOTTI, L.; CERRETANI, A.; CAMPADELLI-FIUME, G.. A Herpes Simplex Virus Recombinant That Exhibits a Single-Chain Antibody to HER2/neu Enters Cells through the Mammary Tumor Receptor, Independently of the gD Receptors. **Journal Of Virology**, [s.l.], v. 80, n. 11, p.5531-5539, 12 maio 2006. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.02725-05>.

MESSERLI, Shanta M. et al. Treatment of Schwannomas with an Oncolytic Recombinant Herpes Simplex Virus in Murine Models of Neurofibromatosis Type 2. **Human Gene Therapy**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.20-30, jan. 2006. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/hum.2006.17.20>.

MEURS, Eliane et al. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. **Cell**, [s.l.], v. 62, n. 2, p.379-390, jul. 1990. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90374-n](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(90)90374-n).

MINETA T, RABKIN SD, MARTUZA RL. Treatment of malignant gliomas using ganciclovir - hypersensitive, ribonucleotide reductase-deficient herpes simplex viral mutant. **Cancer Res.** [s.l.], v. 15, n. 54, p. 3963-3966, 1 ago 1994.

MINETA, Toshihiro et al. Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas. **Nature Medicine**, [s.l.], v. 1, n. 9, p.938-943, set. 1995. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nm0995-938>.

MINEV, Boris R.. **Cancer Management in Man: Chemotherapy, Biological Therapy, Hyperthermia and Supporting Measures**. Si: Springer: Houten, The Netherlands, 2011. 13 v.

MOK, Wilson; BOUCHER, Yves; JAIN, Rakesh K.. Matrix Metalloproteinases-1 and -8 Improve the Distribution and Efficacy of an Oncolytic Virus. **Cancer Research**, [s.l.], v. 67, n. 22, p.10664-10668, 15 nov. 2007. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-07-3107>.

MOLS, Floortje et al. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy and its association with quality of life: a systematic review. **Supportive Care In Cancer**, [s.l.], v. 22, n. 8, p.2261-2269, 1 maio 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00520-014-2255-7>.

MOLS, Floortje et al. Quality of life among long-term breast cancer survivors: A systematic review. **European Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 41, n. 17, p.2613-2619, nov. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2005.05.017>.

MOMENIMOVAHED, Zohre; SALEHINIYA, Hamid. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, [s.l.], v. 11, p.151-164, abr. 2019. Dove Medical Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2147/bctt.s176070>.

MORAES, M. F. A mortalidade por câncer de mama no Brasil [Mortality from breast cancer in Brazil]. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 1998;44:2. Portuguese.

MORIZONO, Kouki et al. Lentiviral vector retargeting to P-glycoprotein on metastatic melanoma through intravenous injection. **Nature Medicine**, [s.l.], v. 11, n. 3, p.346-352, 13 fev. 2005. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1192>.

MORRISON, Joanne et al. Virotherapy of Ovarian Cancer With Polymer-cloaked Adenovirus Retargeted to the Epidermal Growth Factor Receptor. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 16, n. 2, p.244-251, fev. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.mt.6300363>.

MOURIDSEN, H et al. Letrozole Therapy Alone or in Sequence with Tamoxifen in Women with Breast Cancer. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 361, n. 8, p.766-776, 20 ago. 2009. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa0810818>.

MSAOUEL P, DISPENZIERI A, GALANIS E. Clinical testing of engineered oncolytic measles virus strains in the treatment of cancer: an overview. **Curr Opin Mol Ther**, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 43-53, fev. 2009.

MSAOUEL, Pavlos et al. Oncolytic measles virus strains as novel anticancer agents. **Expert Opinion On Biological Therapy**, [s.l.], v. 13, n. 4, p.483-502, 6 jan. 2013. Informa Healthcare. <http://dx.doi.org/10.1517/14712598.2013.749851>.

MULLEN, John T. et al. Oncolysis by viral replication and inhibition of angiogenesis by a replication-conditional herpes simplex virus that expresses mouse endostatin. **Cancer**, [s.l.], v. 101, n. 4, p.869-877, 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.20434>.

MURAWA, Paweł et al. Breast cancer: Actual methods of treatment and future trends. **Reports Of Practical Oncology & Radiotherapy**, [s.l.], v. 19, n. 3, p.165-172, maio 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rpor.2013.12.003>.

NAGANO, S. et al. Cancer Cell Death Enhances the Penetration and Efficacy of Oncolytic Herpes Simplex Virus in Tumors. **Cancer Research**, [s.l.], v. 68, n. 10, p.3795-3802, 15 maio 2008. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-07-6193>.

NAKAMURA, H et al. Multimodality therapy with a replication-conditional herpes simplex virus 1 mutant that expresses yeast cytosine deaminase for intratumoral conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil. **Cancer Res**. [s.l.], v. 14, n. 61, p. 5447-5452, 15 julho 2001.

NANNI, Patrizia et al. Preclinical Therapy of Disseminated HER-2+ Ovarian and Breast Carcinomas with a HER-2-Retargeted Oncolytic Herpesvirus. **Plos Pathogens**, [s.l.], v. 9, n. 1, e1003155, 31 jan. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003155>.

NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK. NCCN Clinical Practice Guidelines (NCCN Guidelines). **Breast Cancer**. Versao 4. 2017. Estados Unidos da America: NCCN, 2018. Disponível em <[https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/default.aspx](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx)> Acesso em: 12 agosto 2019.

NECHAEV, I. N. et al. Express Analysis of HER-2/NEU Status in Breast Cancer Biopsy Specimens. **Bulletin Of Experimental Biology And Medicine**, [s.l.], v. 155, n. 4, p.522-526, ago. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10517-013-2192-3>.

NGUYEN, Andrew; HO, Louisa e WAN, Yonghong. Chemotherapy and oncolytic virotherapy: advanced tactics in the war against cancer. **Frontiers in Oncology**, [s.l.], v. 4, n. 8, 11 jun. 2014.

NGUYEN, Nam P. et al. Molecular biology of breast cancer stem cells: Potential clinical applications. **Cancer Treatment Reviews**, [s.l.], v. 36, n. 6, p.485-491, out. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2010.02.016>.

NORDEN, Andrew D; DRAPPATZ, Jan; WEN, Patrick y. Novel anti-angiogenic therapies for malignant gliomas. **The Lancet Neurology**, [s.l.], v. 7, n. 12, p.1152-1160, dez. 2008. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422\(08\)70260-6](http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422(08)70260-6).

O'BRYAN, Samia M.; MATHIS, J. Michael. Oncolytic Virotherapy for Breast Cancer Treatment. **Current Gene Therapy**, [s.l.], v. 18, n. 4, p.192-205, 4 out. 2018. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1566523218666180910163805>.

O'RIORDAN, Catherine R. et al. PEGylation of Adenovirus with Retention of Infectivity and Protection from Neutralizing Antibody in Vitro and in Vivo. **Human Gene Therapy**, [s.l.], v. 10, n. 8, p.1349-1358, 20 maio 1999. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/10430349950018021>.

PANIS, Carolina et al. Breast cancer in Brazil: epidemiology and treatment challenges. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, [s.l.], p.43-49, jan. 2015. Dove Medical Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2147/bcct.s50361>.

PAPANASTASSIOU, V et al. The potential for efficacy of the modified (ICP 34.5-) herpes simplex virus 1716 following intratumoural injection into human malignant glioma: a proof of



principle study. **Gene Therapy**, [s.l.], v. 9, n. 6, p.398-406, mar. 2002. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.gt.3301664>.

PARKER, J. N. et al. Engineered herpes simplex virus expressing IL-12 in the treatment of experimental murine brain tumors. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 97, n. 5, p.2208-2213, 18 fev. 2000. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.040557897>.

PARSA, Yekta et al. A Review of the Clinical Implications of Breast Cancer Biology. **Electronic Physician**, [s.l.], v. 8, n. 5, p.2416-2424, 25 maio 2016. Mehr Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.19082/2416>.

PASTEUR, L. Methode pour prevenir la rage apres morsure. **C. R. Acad. Sci.** [s.l.], p. 762-772. out. 1885.

PAWLIK, Timothy M. et al. Prodrug bioactivation and oncolysis of diffuse liver metastases by a herpes simplex virus 1 mutant that expresses the CYP2B1 transgene. **Cancer**, [s.l.], v. 95, n. 5, p.1171-1181, 19 ago. 2002. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.10776>.

PELNER, L; FOWLER, GA; NAUTS, HA. Effects of concurrent infections and their toxins on the course of leukemia. **Acta Med Scand Suppl.** [s.l.], p. 5-24. dezembro. 1958.

PEREZ, Omar D et al. Design and Selection of Toca 511 for Clinical Use: Modified Retroviral Replicating Vector With Improved Stability and Gene Expression. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 20, n. 9, p.1689-1698, set. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2012.83>.

PEROU, Charles M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, [s.l.], v. 406, n. 6797, p.747-752, ago. 2000. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/35021093>.

PETER B, BERNARD L. **World Cancer Report**. International Agency for Research on Cancer; WHO Press, Lyon, France; 2008.

PETERS, Cole et al. Oncolytic viruses on the cusp of success?: proceedings of the 9th International Conference on Oncolytic Virus Therapeutics. **Molecular Therapy - Oncolytics**, [s.l.], v. 3, p.16016-16020, 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1038/mto.2016.16>.

PICCART-GEBHART, Martine J. et al. Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 353, n. 16, p.1659-1672, 20 out. 2005. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa052306>.

PIRHARDT, C. R.; MERCÊS, N. N. A. Fatores de risco para câncer de mama: nível de conhecimento dos acadêmicos de uma universidade. **Rev. Enferm. UERJ**, v. 17, n. 1, p. 102-6, jan,-mar., 2009.

PONTI, Dario et al. Breast cancer stem cells: An overview. **European Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 42, n. 9, p.1219-1224, jun. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2006.01.031>.

PÖTTER, Richard et al. Lumpectomy Plus Tamoxifen or Anastrozole With or Without Whole Breast Irradiation in Women With Favorable Early Breast Cancer. **International Journal Of Radiation Oncology\*biology\*physics**, [s.l.], v. 68, n. 2, p.334-340, jun. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijrobp.2006.12.045>.

R, Davies Peto et al. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100 000 women in 123 randomised trials. **The Lancet**, [s.l.], v. 379, n. 9814, p.432-444, fev. 2012. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(11\)61625-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(11)61625-5).

RAMPLING, R et al. Toxicity evaluation of replication-competent herpes simplex virus (ICP 34.5 null mutant 1716) in patients with recurrent malignant glioma. **Gene Therapy**, [s.l.], v. 7, n. 10, p.859-866, maio 2000. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.gt.3301184>.

RODRIGUEZ-GARCIA, A. et al. Safety and Efficacy of VCN-01, an Oncolytic Adenovirus Combining Fiber HSG-Binding Domain Replacement with RGD and Hyaluronidase Expression. **Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 21, n. 6, p.1406-1418, 12 nov. 2014.

ROGULSKI, K.R et al. In vivo antitumor activity of ONYX-015 is influenced by p53 status and is augmented by radiotherapy. **Cancer Res.**, [s.l.], v. 60, n. 5, p. 1193–1196, mar. 2000.

RYU, Wang-shick. Herpesviruses. **Molecular Virology Of Human Pathogenic Viruses**, [s.l.], p.125-139, 2017. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-800838-6.00009-6>.

SAGARA, M et al. 409. Novel recombinant coxsackievirus B3 infection elicits robust oncolytic activity against human non-small lung cancer and triple-negative breast cancer. **Mol Ther.** Si, p. 162. 2016.

SAHIN, T T et al. Impact of novel oncolytic virus HF10 on cellular components of the tumor microenvironment in patients with recurrent breast cancer. **Cancer Gene Therapy**, [s.l.], v. 19, n. 4, p.229-237, 23 dez. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/cgt.2011.80>.

SANTOS, Marceli de Oliveira. Estimate 2018: Cancer Incidence in Brazil. **Revista Brasileira de Cancerologia**. Rio de Janeiro, p. 119-120. maio 2018. Disponível em: <[http://www1.inca.gov.br/rbc/n\\_64/v01/pdf/15-review-estimate-2018-cancer-incidence-in-brazil.pdf](http://www1.inca.gov.br/rbc/n_64/v01/pdf/15-review-estimate-2018-cancer-incidence-in-brazil.pdf)>. Acesso em: 1 abr. 2019.

SAUER, Torill et al. Assessment of HER-2/neu overexpression and/or gene amplification in breast carcinomas: should in situ hybridization be the method of choice?. **Apmis**, [s.l.], v. 111, n. 3, p.444-450, mar. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0463.2003.t01-1-1110210.x>.

SCHAFFER, S et al. Vaccinia virus-mediated intra-tumoral expression of matrix metalloproteinase 9 enhances oncolysis of PC-3 xenograft tumors. **BMC Cancer**, [s.l.], v. 12, n. 1, 23 ago. 2012.

SCHIETINGER, Andrea et al. Bystander killing of cancer requires the cooperation of CD4+and CD8+T cells during the effector phase. **The Journal Of Experimental Medicine**, [s.l.], v. 207, n. 11, p.2469-2477, 4 out. 2010. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20092450>.

SEDLMAYER, Felix et al. Boost IORT in Breast Cancer: Body of Evidence. **International Journal Of Breast Cancer**, [s.l.], v. 2014, p.1-6, 2014. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/472516>.

SEHRAWAT, Sharvan; KUMAR, Dhaneshwar; ROUSE, Barry T.. Herpesviruses: Harmonious Pathogens but Relevant Cofactors in Other Diseases?. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [s.l.], v. 8, p.1-15, 25 maio 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2018.00177>.

SENA-ESTEVEES, Miguel et al. HSV-1 Amplicon Vectors—Simplicity and Versatility. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.9-15, jul. 2000. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/mthe.2000.0096>.

SENZER, Neil N. et al. Phase II Clinical Trial of a Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor–Encoding, Second-Generation Oncolytic Herpesvirus in Patients With Unresectable Metastatic Melanoma. **Journal Of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 27, n. 34, p.5763-5771, 1 dez. 2009. American Society of Clinical Oncology (ASCO). <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2009.24.3675>.

SETH, Prem et al. Development of Oncolytic Adenovirus Armed with a Fusion of Soluble Transforming Growth Factor- $\beta$  Receptor II and Human Immunoglobulin Fc for Breast Cancer Therapy. **Human Gene Therapy**, [s.l.], v. 17, n. 11, p.1152-1161, nov. 2006. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/hum.2006.17.1152>.

SHAFREN, D. R.. Systemic Therapy of Malignant Human Melanoma Tumors by a Common Cold-Producing Enterovirus, Coxsackievirus A21. **Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.53-60, 1 jan. 2004. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-0690-3>.

SHAYESTEHPUR, Mohammad et al. Targeting human breast cancer cells by an oncolytic adenovirus using microRNA-targeting strategy. **Virus Research**, [s.l.], v. 240, p.207-214, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2017.08.016>.

SHEN, B H; HERMISTON, T W. Effect of hypoxia on Ad5 infection, transgene expression and replication. **Gene Therapy**, [s.l.], v. 12, n. 11, p.902-910, 3 fev. 2005. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.gt.3302448>.

SHEN, Y; NEMUNAITIS, J. Herpes simplex virus 1 (HSV-1) for cancer treatment. **Cancer Gene Therapy**, [s.l.], v. 13, n. 11, p.975-992, 7 abr. 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cgt.7700946>.

SIEGEL, Rebecca L.; MILLER, Kimberly D.; JEMAL, Ahmedin. Cancer statistics, 2019. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, [s.l.], v. 69, n. 1, p.7-34, jan. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21551>.

SINN, Hans-peter; KREIPE, Hans. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. **Breast Care**, [s.l.], v. 8, n. 2, p.149-154, 2013. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000350774>.

SMITH, Tyrel T.; WHITLEY, Richard J.. Herpesviruses. **Infectious Diseases**, [s.l.], p.1426-1438, 2017. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-7020-6285-8.00166-0>.

SOUTHAM, Chester M.; MOORE, Alice E.. Clinical studies of viruses as antineoplastic agents, with particular reference to egypt 101 virus. **Cancer**, [s.l.], v. 5, n. 5, p.1025-1034, set. 1952. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1002/1097-0142\(195209\)5:53.0.co;2-q](http://dx.doi.org/10.1002/1097-0142(195209)5:53.0.co;2-q).

SOVA, Pavel et al. A Tumor-Targeted and Conditionally Replicating Oncolytic Adenovirus Vector Expressing TRAIL for Treatment of Liver Metastases. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 9, n. 4, p.496-509, abr. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2003.12.008>.

STOJDL, David F. et al. Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. **Nature Medicine**, [s.l.], v. 6, n. 7, p.821-825, jul. 2000. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/77558>.

TAI, Chien-kuo. Replication-competent retrovirus vectors for cancer gene therapy. **Frontiers In Bioscience**, [s.l.], v. 13, n. 13, p.3083-3095, 2008. Frontiers in Bioscience. <http://dx.doi.org/10.2741/2910>.

TAKAOKA, Akinori et al. Integration of interferon- $\alpha/\beta$  signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. **Nature**, [s.l.], v. 424, n. 6948, p.516-523, jul. 2003. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature01850>.

TAYLOR, C.w.; MCGALE, P.; DARBY, S.c.. Cardiac Risks of Breast-cancer Radiotherapy: A Contemporary View. **Clinical Oncology**, [s.l.], v. 18, n. 3, p.236-246, abr. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clon.2005.11.003>.

TESFAY, M. Z. et al. PEGylation of Vesicular Stomatitis Virus Extends Virus Persistence in Blood Circulation of Passively Immunized Mice. **Journal Of Virology**, [s.l.], v. 87, n. 7, p.3752-3759, 16 jan. 2013. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.02832-12>.

THOMPSON, R.l.; WAGNER, E.k.; STEVENS, J.g.. Physical location of a herpes simplex virus type-1 gene function(s) specifically associated with a 10 million-fold increase in alphaherpesvírus humano 1 neurovirulence. **Virology**, [s.l.], v. 131, n. 1, p.180-192, nov. 1983. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(83\)90544-5](http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(83)90544-5).

TODA, M; MARTUZA, Rl; RABKIN, Sd. Combination suicide/cytokine gene therapy as adjuvants to a defective herpes simplex virus-based cancer vaccine. **Gene Therapy**, [s.l.], v. 8, n. 4, p.332-339, fev. 2001. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.gt.3301392>.

TODA, Masahiro et al. Herpes Simplex Virus as an in Situ Cancer Vaccine for the Induction of Specific Anti-Tumor Immunity. **Human Gene Therapy**, [s.l.], v. 10, n. 3, p.385-393, 10 fev. 1999. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/10430349950018832>.

TODA, Masahiro; MARTUZA, Robert L.; RABKIN, Samuel D.. Tumor Growth Inhibition by Intratumoral Inoculation of Defective Herpes Simplex Virus Vectors Expressing Granulocyte–Macrophage Colony-Stimulating Factor. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 2, n. 4, p.324-329, out. 2000. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/mthe.2000.0130>.

TODA, Masahiro; RABKIN, Samuel D.; MARTUZA, Robert L.. Treatment of Human Breast Cancer in a Brain Metastatic Model by G207, a Replication-Competent Multimutated Herpes

Simplex Virus 1. **Human Gene Therapy**, [s.l.], v. 9, n. 15, p.2177-2185, 10 out. 1998. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/hum.1998.9.15-2177>.

TODO, T et al. *In situ* expression of soluble B7-1 in the context of oncolytic herpes simplex virus induces potent antitumor immunity. **Cancer Res.** [s.l.], v. 1, n. 61, p. 153-161. 2001.

TODO, T et al. Oncolytic herpes simplex virus (G207) therapy: from basic to clinical. In: Maruta H, ed. *Tumor-Suppressing Viruses, Genes, and Drugs*. **Academic Press**. San Diego, p. 45–75. 2002.

TODO, T. et al. Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I presentation and tumor cell killing. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 98, n. 11, p.6396-6401, 15 maio 2001. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.101136398>.

TODO, Tomoki et al. Corticosteroid Administration Does Not Affect Viral Oncolytic Activity, but Inhibits Antitumor Immunity in ReplicationCompetent Herpes Simplex Virus Tumor Therapy. **Human Gene Therapy**, [s.l.], v. 10, n. 17, p.2869-2878, 20 nov. 1999. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/10430349950016591>.

TODO, Tomoki et al. Systemic Antitumor Immunity in Experimental Brain Tumor Therapy Using a Multimutated, Replication-Competent Herpes Simplex Virus. **Human Gene Therapy**, [s.l.], v. 10, n. 17, p.2741-2755, 20 nov. 1999. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/10430349950016483>.

TODO, Tomoki. Oncolytic virus therapy using genetically engineered herpes simplex viruses. **Frontiers In Bioscience**, [s.l.], v. 13, n. 13, p.2060-2064, 2008. Frontiers in Bioscience. <http://dx.doi.org/10.2741/2823>.

TOSONI, Daniela et al. Pre-clinical validation of a selective anti-cancer stem cell therapy for Numb-deficient human breast cancers. **Embo Molecular Medicine**, [s.l.], v. 9, n. 5, p.655-671, 15 mar. 2017. EMBO. <http://dx.doi.org/10.15252/emmm.201606940>.

TYSOME JR, LEMOINE NR, WANG Y. Combination of antiangiogenic therapy and virotherapy: arming oncolytic viruses with anti-angiogenic genes. **Curr Opin Mol Ther.** [s.l.], v. 6, n. 11 p. 664-669, dezembro 2009.

UCHIDA, Hiroaki et al. Effective Treatment of an Orthotopic Xenograft Model of Human Glioblastoma Using an EGFR-retargeted Oncolytic Herpes Simplex Virus. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 21, n. 3, p.561-569, mar. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2012.211>.

UNIAO INTERNACIONAL CONTRA O CANCER. **TNM: Classificacao de Tumores Malignos.** Traducao Instituto Nacional de Cancer. 7. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2012.

VARGHESE, Susan; RABKIN, Samuel D. Oncolytic herpes simplex virus vectors for cancer virotherapy. **Cancer Gene Therapy**, [s.l.], v. 9, n. 12, p.967-978, 22 nov. 2002. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cgt.7700537>.

VECCHIO, M. del et al. Interleukin-12: Biological Properties and Clinical Application. **Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 13, n. 16, p.4677-4685, 15 ago. 2007. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-07-0776>.

VELASCO-VELÁZQUEZ, Marco A. et al. Breast cancer stem cells. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, [s.l.], v. 44, n. 4, p.573-577, abr. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2011.12.020>.

VERRI, Elena et al. HER2/neu Oncoprotein Overexpression in Epithelial Ovarian Cancer: Evaluation of its Prevalence and Prognostic Significance. **Oncology**, [s.l.], v. 68, n. 2-3, p.154-161, 2005. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000086958>.

VINAY K, ABUL KA, JON CA, NELSON F. **Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease.** 8ª edição. Elsevier, Lyon, França; 2010.



Viralytics. Viralytics reports positive final results from Cavatak phase II melanoma trial. Disponível em: <<http://www.asx.com.au/asxpdf/20150602/pdf/42yy9ntnfyw9vy.pdf>>. Acesso em: 6 Setembro, 2019.

WAKS, Adrienne G.; WINER, Eric P.. Breast Cancer Treatment. **Jama**, [s.l.], v. 321, n. 3, p.288-300, 22 jan. 2019. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2018.19323>.

WALKER, J. D.; SEHGAL, I.; KOUSOULAS, K. G.. Oncolytic Herpes Simplex Virus 1 Encoding 15-Prostaglandin Dehydrogenase Mitigates Immune Suppression and Reduces Ectopic Primary and Metastatic Breast Cancer in Mice. **Journal Of Virology**, [s.l.], v. 85, n. 14, p.7363-7371, 4 maio 2011. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.00098-11>.

WANG, Huiqiang et al. Oncolytic vaccinia virus GLV-1h68 strain shows enhanced replication in human breast cancer stem-like cells in comparison to breast cancer cells. **Journal Of Translational Medicine**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.167-182, 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1479-5876-10-167>.

WANG, J et al. Oncolytic herpes simplex virus treatment of metastatic breast cancer. **Int J Onco. Si**, p. 757-63. 2012.

WERUTSKY, Gustavo; NUNES, Paulo; BARRIOS, Carlos. Locally advanced breast cancer in Brazil: current status and future perspectives. **Ecancermedicalsecience**, [s.l.], v. 13, n. 895, p.1-15, 22 jan. 2019. Ecancer Global Foundation. <http://dx.doi.org/10.3332/ecancer.2019.895>.

WHELAN, Timothy J. et al. Long-Term Results of Hypofractionated Radiation Therapy for Breast Cancer. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 362, n. 6, p.513-520, 11 fev. 2010. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa0906260>.

WILLIS, N.j. Edward Jenner and the eradication of smallpox. **Scott. Med. J.** [s.l.], p. 118-121. jul. 1997.

WHO, World Health Organization. **Brazil: Source Globocan 2018**. Disponível em: <<http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/76-brazil-fact-sheets.pdf>> Acesso em: 17 de agosto de 2019.

WHO, World Health Organization. **Breast: Source Globocan 2018**. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf>> Acesso em: 17 de agosto de 2019.

WHO, World Health Organization. **Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018**. Disponível em: <[https://www.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/09/pr263\\_E.pdf](https://www.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/09/pr263_E.pdf)> Acesso em: 31 de agosto de 2019.

WHO, World Health Organization. **World: Source Globocan 2018**. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>> Acesso em: 25 de agosto de 2019.

WOLFF, Antonio C. et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. **Journal Of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 31, n. 31, p.3997-4013, nov. 2013. American Society of Clinical Oncology (ASCO). <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2013.50.9984>.

WONG, Han Hsi; LEMOINE, Nicholas; WANG, Yaohe. Oncolytic Viruses for Cancer Therapy: Overcoming the Obstacles. **Viruses**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.78-106, 11 jan. 2010. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v2010078>.

WONG, Richard J. et al. Angiogenesis Inhibition by an Oncolytic Herpes Virus Expressing Interleukin 12. **Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 10, n. 13, p.4509-4516, 1 jul. 2004. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-04-0081>.

WONG, Richard J. et al. Cytokine Gene Transfer Enhances Herpes Oncolytic Therapy in Murine Squamous Cell Carcinoma. **Human Gene Therapy**, [s.l.], v. 12, n. 3, p.253-265, 10 fev. 2001. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/10430340150218396>.

WONG, RJ et al. Effective intravenous therapy of murine pulmonary metastases with an oncolytic herpes virus expressing interleukin 12. **Clin Cancer Res.** [s.l.], v. 1 pt 1, n. 10 p. 251-259. 2004.

WOOSTER, Richard et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. **Nature**, [s.l.], v. 378, n. 6559, p.789-792, dez. 1995. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/378789a0>.

XIA ZJ, et al. Phase III randomized clinical trial of intratumoral injection of E1B gene-deleted adenovirus (H101) combined with cisplatin-based chemotherapy in treating squamous cell cancer of head and neck or esophagus. **Ai Zheng**, [s.l.], v. 23, n. 12, p. 1666–1670, dez. 2004.

YANG, Yuefeng et al. Systemic Delivery of an Oncolytic Adenovirus Expressing Decorin for the Treatment of Breast Cancer Bone Metastases. **Human Gene Therapy**, [s.l.], v. 26, n. 12, p.813-825, dez. 2015. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/hum.2015.098>.

YAZAKI, T et al. Treatment of human malignant meningiomas by G207, a replication-competent multimitated herpes simplex virus 1. **Cancer Res.** [s.l.], v. 21, n. 55, p. 4752-4756. 1 novembro 1995.

YOON, SS et al. An oncolytic herpes simplex virus type 1 selectively destroys diffuse liver metastases from colon carcinoma. **FASEB J.** [s.l.], v. 2, n. 14, p. 301–311, fevereiro 2000.

YORK, Ian A. et al. A cytosolic herpes simplex virus protein inhibits antigen presentation to CD8+ T lymphocytes. **Cell**, [s.l.], v. 77, n. 4, p.525-535, maio 1994. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90215-1](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(94)90215-1).

YOU, Zongbing et al. Coxsackievirus–adenovirus receptor expression in ovarian cancer cell lines is associated with increased adenovirus transduction efficiency and transgene expression. **Cancer Gene Therapy**, [s.l.], v. 8, n. 3, p.168-175, mar. 2001. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cgt.7700284>.

YU, Y. A. et al. Regression of human pancreatic tumor xenografts in mice after a single systemic injection of recombinant vaccinia virus GLV-1h68. **Molecular Cancer Therapeutics**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.141-151, 1 jan. 2009. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.mct-08-0533>.

YU, Z.. Enhanced Nectin-1 Expression and Herpes Oncolytic Sensitivity in Highly Migratory and Invasive Carcinoma. **Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 11, n. 13, p.4889-4897, 1 jul. 2005. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-05-0309>.

ZAMARIN, Dmitriy et al. Oncolytic Newcastle disease virus for cancer therapy: old challenges and new directions. **Future Microbiology**, [s.l.], v. 7, n. 3, p.347-367, mar. 2012. Future Medicine Ltd. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.12.4>.

ZENG, Wei-gen et al. An oncolytic herpes simplex virus vector, G47 $\Delta$ , synergizes with paclitaxel in the treatment of breast cancer. **Oncology Reports**, [s.l.], v. 29, n. 6, p.2355-2361, 22 mar. 2013. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/or.2013.2359>.

ZENG, Weigen et al. The oncolytic herpes simplex virus vector G47 $\Delta$  effectively targets breast cancer stem cells. **Oncology Reports**, [s.l.], v. 29, n. 3, p.1108-1114, 24 dez. 2013. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/or.2012.2211>.

ZEYAUULLAH, Md. et al. Oncolytic Viruses in the Treatment of Cancer: A Review of Current Strategies. **Pathology & Oncology Research**, [s.l.], v. 18, n. 4, p.771-781, 20 jun. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-012-9548-2>.

ZHANG, Jie; FROLOV, Ilya; RUSSELL, Stephen J.. Gene therapy for malignant glioma using Sindbis vectors expressing a fusogenic membrane glycoprotein. **The Journal Of Gene Medicine**, [s.l.], v. 6, n. 10, p.1082-1091, 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jgm.605>.

ZHENG, Meijun et al. Oncolytic Viruses for Cancer Therapy: Barriers and Recent Advances. **Molecular Therapy - Oncolytics**, [s.l.], v. 15, p.234-247, dez. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.omto.2019.10.007>.

ZHU, Bing et al. Gene Therapy of Lung Adenocarcinoma using Herpes Virus Expressing a Fusogenic Membrane Glycoprotein. **Cell Biochemistry And Biophysics**, [s.l.], v. 69, n. 3, p.583-587, 9 fev. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12013-014-9836-4>.

ZHUANG, Xiufen et al. Doxorubicin-enriched, ALDHbr mouse breast cancer stem cells are treatable to oncolytic herpes simplex virus type 1. **Bmc Cancer**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.1-16, 23 nov. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-12-549>.