



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

MIREILLE STOCK

Adenocarcinoma Pancreático: Fisiopatologia e Viroterapia

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE FISIOPATOLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:

PROFESSOR DOUTOR RUI VASCO QUINTAIS GRADIZ

PROFESSORA DOUTORA ANABELA MOTA PINTO

ABRIL 2018

SUMÁRIO

Resumo	02
Abstract	03
I – Introdução	04
II – Materiais e Métodos	09
III – Adenocarcinoma pancreático	11
IV – Viroterapia	21
1. Introdução histórica	21
2. Vírus oncolíticos	23
3. Mecanismos antitumorais dos vírus oncolíticos	24
4. Limitações	27
4.1. Seletividade	27
4.2. Microambiente	28
4.3. Neutralização	29
4.4. Administração	29
4.5. Resistência	30
5. Ensaios clínicos	30
V – Viroterapia no adenocarcinoma pancreático	33
1. <i>Adenovirus</i>	33
2. <i>Herpes</i>	36
3. <i>Parvovirus</i>	38
4. <i>Reovírus</i>	40
5. Vírus da doença de Newcastle	41
6. Vírus do sarampo	43
7. Vaccinia vírus	44
8. Síntese	45
VI – Discussão e Conclusão	47
Abreviaturas e Acrônimos	49
Índice de Tabelas	51
Índice de Figuras	52
Agradecimentos	53
Referências bibliográficas	54

RESUMO

O adenocarcinoma pancreático representa cerca de 90% dos tumores pancreáticos e é uma neoplasia maligna agressiva (5% de sobrevida aos 5 anos), altamente resistente à terapêutica vigente e com uma incidência crescente. O microambiente tumoral contribui grandemente para as suas características proliferativas, invasivas e de resistência e constitui um dos grandes obstáculos à terapia convencional. Nas lesões pré-neoplásicas (neoplasia intraepitelial pancreática, neoplasia papilar intraductal mucinosa e neoplasia cística mucinosa) que dão origem a este tumor, as mutações genéticas mais prevalentes são a ativação do proto-oncogene *KRAS* e a inativação dos genes supressores tumorais *CDKN2A*, *TP53* e *SMAD4*, presentes em graus variáveis.

A resistência à quimioterapia, cirurgia e radioterapia motivou a busca de novas opções terapêuticas que melhorassem o prognóstico. Atualmente, a viroterapia é reconhecida como uma abordagem alternativa promissora. Neste trabalho de revisão, foram abordados o *Adenovirus*, o *Herpes simplex virus*, o *Parvovirus*, o *Reovirus*, o vírus da doença de Newcastle, o vírus do sarampo e o *Vaccinia virus* por se tratarem dos vírus mais utilizados nos ensaios pré-clínicos e clínicos direcionados à neoplasia em questão.

Os resultados iniciais são positivos, revelando-se estes vírus, de uma forma geral, eficazes (*in vitro* e *in vivo*), seguros e bem tolerados. Porém, há ainda um longo caminho a percorrer na medida em que a maior parte dos ensaios clínicos ainda não ultrapassou a fase I e que não existem estudos que comparem dados referentes a diferentes famílias virais. Por outro lado, faltam métodos que maximizem a biodisponibilidade e muitos dos mecanismos antitumorais estão ainda por esclarecer.

Palavras-chave: adenocarcinoma ductal pancreático, fisiopatologia, viroterapia oncolítica, vírus oncolítico, terapêutica.

ABSTRACT

The pancreatic adenocarcinoma represents about 90% of pancreatic tumours and it is an aggressive malignant neoplasm (5-year survival of 5%), highly resistant to the current therapeutics and with a growing incidence. The tumor microenvironment greatly contributes to its proliferative, invasive and resistant characteristics and constitutes one of the biggest obstacles to conventional therapeutics. In the pre-neoplastic lesions (pancreatic intraepithelial neoplasia, intraductal papillary mucinous and mucinous cystic neoplasms) that give rise to this tumor, the most prevalent genetic mutations are the activation of the proto-oncogene *KRAS* and the inactivation of the tumor suppressor genes *CDKN2A*, *TP53* e *SMAD4*, present in varying degrees.

The resistance to chemotherapy, surgery and radiotherapy motivated the search for new therapeutic options that would improve the prognosis. Presently, virotherapy has been recognized as a promising alternative approach. In this review, the *Adenovirus*, the *Herpes simplex virus*, the *Parvovirus*, the *Reovirus*, the measles virus, the Newcastle disease virus and the *Vaccinia virus* were addressed for being the most utilized in preclinical and clinical trials directed to the neoplasm in question.

The initial results were positive and the viruses proved to be, in general, effective (*in vitro* e *in vivo*), safe and well tolerated. However, there is still a long way to go given that most clinical trials have not overcome phase I and that there are no studies comparing data on different viral families. On the other hand, methods to maximize bioavailability are lacking and many of the antitumor mechanisms remain unknown.

Keywords: pancreatic ductal adenocarcinoma, pathophysiology, oncolytic virotherapy, oncolytic virus, therapeutic.

I – INTRODUÇÃO

O adenocarcinoma pancreático (ACP) é uma das neoplasias malignas mais resistente ao tratamento e mais mortal, especialmente, se localmente avançado e/ou associado a metástases, pelo que constitui um dos grandes desafios da investigação médica. [1,2]

A importância e o interesse deste trabalho residem no facto de se ter verificado, ao longo dos últimos 40 anos, um aumento da incidência do ACP. [2] A sobrevivência aos 5 anos é pior do que a de outros cancros [3] e continua a não exceder os 5%, independentemente do estágio de diagnóstico. [4,5]

Apesar de constituir apenas 3 a 7% da incidência das doenças oncológicas, [3,4] o ACP ocupa o 7º lugar no *ranking* de mortalidade por cancro. Estima-se que anualmente 338.000 pessoas sejam diagnosticadas com ACP e que 331.000 sucumbam à doença. O ACP é diagnosticado em mais de 88% dos doentes após os 55 anos de idade, sendo a idade média na altura do diagnóstico de 71 anos e é sete vezes mais frequente nos países desenvolvidos comparativamente aos países em desenvolvimento. [3]

Os principais fatores de risco são: diabetes, pancreatite crónica, tabagismo, excesso de peso/obesidade, o envelhecimento e o alcoolismo. [4]

São muitos os fatores que contribuem para o mau prognóstico associado ao ACP, nomeadamente, o estágio avançado na altura do diagnóstico, presença de metástases e uma má resposta à quimioterapia e à radioterapia. [1,2] O diagnóstico é geralmente tardio e normalmente querer doseamento de marcadores uma vez que os doentes dificilmente apresentam semiologia. O marcador tumoral mais usado como auxiliar de diagnóstico é o CA 19-9 (*carbohydrate antigen 19-9* – antígeno carbohidrato 19-9), mas tem uma sensibilidade e uma especificidade que variam entre 69 e 98% e entre 46 e 98%, respetivamente. Acresce

ainda o fato de o CA 19-9 não ser específico do ACP e haver mesmo pessoas incapazes de o produzir. [6]

O estadiamento do ACP é feito com base na classificação TNM (Tumor, Nódulo, Metástase) (**Tabela 1**), que caracteriza o crescimento local e disseminado do tumor e que se correlaciona com o prognóstico da patologia. [5]

Tabela 1 – Classificação TNM

Adaptado de [5].

<i>T = tumor primário</i>	
TX	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Ausência de evidência de tumor
Tis	Tumor <i>in situ</i>
T1	Tumor restrito ao pâncreas, ≤ 2 cm de maior diâmetro
T2	Tumor restrito ao pâncreas, > 2 cm de maior diâmetro
T3	Tumor estende-se para além do pâncreas, sem envolvimento do eixo celíaco ou da artéria mesentérica superior
T4	Tumor invade o eixo celíaco ou a artéria mesentérica superior
<i>N = nódulos linfáticos regionais</i>	
NX	Nódulos linfáticos regionais não podem ser avaliados
N1	Sem metástases nos nódulos linfáticos regionais
N2	Com metástases nos nódulos linfáticos regionais
<i>M = metástases à distância</i>	
M0	Sem metástases à distância
M1	Com metástases à distância

Em função das características encontradas, o tumor pode ser categorizado em estádios de 0 a IV e determinado como ressecável, ressecável *borderline* ou irressecável (**Tabela 2**). [5]

Tabela 2 – Estadiamento do Adenocarcinoma Pancreático

Adaptado de [5].

0 (Tis, N0, M0)	Carcinoma <i>in situ</i>	
IA (T1, N0, M0)	Localizado	Ressecável
IB (T2, N0, M0)	Localizado	
IIA (T3, N0, M0)	Localmente invasivo	Ressecável ou ressecável
IIB (T1-3, N1, M0)	Localmente invasivo	<i>borderline</i> , se T3 extenso
III (T4, qualquer N, M0)	Localmente avançado	Ressecável <i>borderline</i> ou irressecável
IV (qualquer T, qualquer N, M1)	Metástases à distância	Irressecável

A única opção curativa disponível é a cirurgia, que só é possível em aproximadamente 15% dos doentes, uma vez que a grande maioria (85%) dos doentes é diagnosticada *ab initio* com tumores irresssecáveis. [2] Nestes casos, a alternativa é a quimioterapia. A convencional, já estabelecida há vários anos, é feita com gemcitabina isolada ou em combinação com outros agentes de quimioterapia. Mais recentemente, surgiram o regime FOLFIRINOX (ácido folínico, 5-fluorouracil, irinotecano e oxaliplatina) [5,7,8] e o regime nab-paclitaxel/gemcitabina [1] que, quando comparados com a gemcitabina isolada, apresentam melhorias significativas em relação ao tempo livre de progressão de doença e à resposta objetiva por parte dos doentes. Com os novos regimes, cerca de 10% dos doentes sobrevivem até aos 2 anos, algo raro para esta patologia. No entanto, estão associados a uma maior toxicidade. [9] Por essa razão são apenas administrados a doentes com um bom estado geral (*performance status*). [5,7] A gestão terapêutica encontra-se resumida na **Fig. 1**.

Dos doentes que são submetidos a cirurgia, menos de 30% sobrevive ao procedimento [10] e nos casos em que a cura é possível, existe uma probabilidade muito elevada de recidiva, [11] que ocorre em 50 a 80% dos doentes ao fim de um ano. [9] Ainda assim, nos doentes com doença localizada a sobrevivência aos 5 anos pode chegar a aproximadamente 25%. [3]

Face a estes resultados, é imperativo e urgente encontrar novas estratégias terapêuticas que consigam um efeito positivo importante sobre o prognóstico do ACP. Assim, este trabalho de revisão tem como objetivo primário abordar a viroterapia como alternativa ao tratamento atual do ACP.

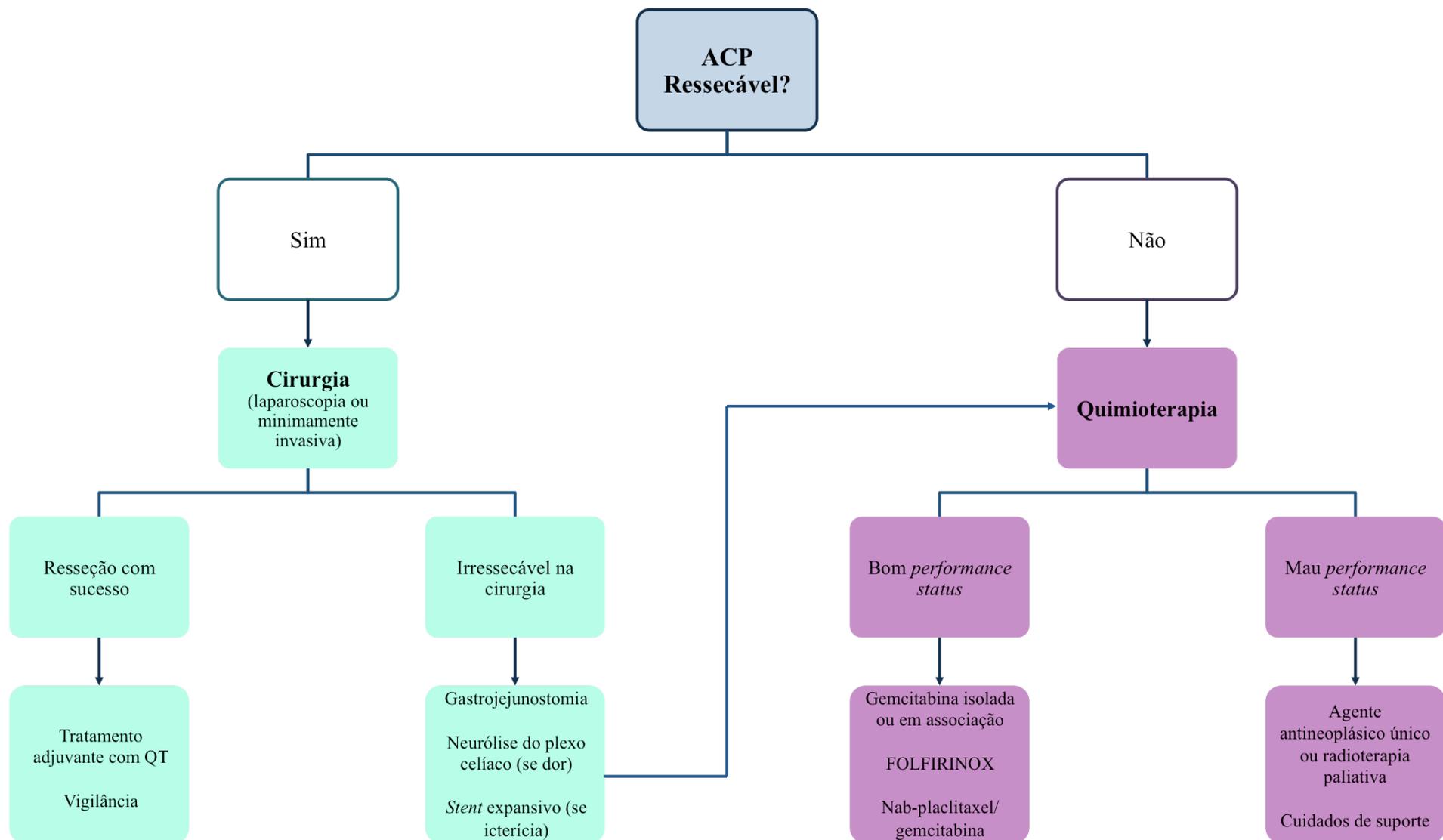


Figura 1 – Gestão terapêutica do adenocarcinoma pancreático. Adaptado de [5,8].

A viroterapia foi recentemente reconhecida como uma abordagem promissora ao tratamento da doença oncológica. [12] Baseia-se na replicação seletiva dos vírus oncolíticos dentro das células tumorais, [13,14] podendo esses vírus ser *wild type* ou geneticamente modificados para o efeito. [13,14] Os vírus oncolíticos têm a capacidade de lisar as células cancerígenas e de ativar mecanismos de imunidade antitumoral [13] local ou sistêmica. [16] A viroterapia poderá assim ser o próximo grande passo no tratamento do cancro, nomeadamente do ACP. [12]

Os agentes terapêuticos virais em estudo mais preponderantes são o *Adenovirus* (AV), o *Herpes simplex virus* (HSV), o *Parvovirus* (PV), o *Reovirus* (RV), o vírus da doença de Newcastle (VDN), o vírus do sarampo (VS) e o *Vaccinia virus* (VV), pelo que neste trabalho foram alvo de uma pesquisa mais aprofundada. [13,15]

Como os mecanismos de indução de citotoxicidade destes vírus diferem de uns para os outros, [13] este trabalho tem também como objetivo investigar qual ou quais destes vírus são os mais eficazes e seguros para efeitos de viroterapia.

II – MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização da presente revisão bibliográfica, foram efetuadas pesquisas na *PubMed* e na *Cochrane Library*, no período compreendido entre agosto (primeira pesquisa a 14 de agosto de 2017) e fevereiro de 2018 (última pesquisa a 26 de fevereiro de 2018).

Para esse efeito, foram utilizados os seguintes termos de pesquisa:

- “Carcinoma, pancreatic ductal” AND “Therapeutics”;
- “Carcinoma, pancreatic ductal” AND “Physiopathology”;
- “Oncolytic virus”;
- “Carcinoma, pancreatic ductal” AND “Oncolytic virus”;
- “Carcinoma, pancreatic ductal” AND “Virus”;
- “Carcinoma, pancreatic ductal” AND “Adenovirus”;
- “Carcinoma, pancreatic ductal” AND “Herpes simplex virus”;
- “Carcinoma, pancreatic ductal” AND “Parvovirus”;
- “Carcinoma, pancreatic ductal” AND “Reovirus”;
- “Carcinoma, pancreatic ductal” AND “Measles virus”;
- “Carcinoma, pancreatic ductal” AND “Newcastle disease virus”;
- “Carcinoma, pancreatic ductal” AND “Vaccinia virus”.

Os critérios de inclusão foram os seguintes:

- Data de publicação compreendida entre 01 de janeiro de 2012 e 26 de fevereiro de 2018;
- Artigos originais e de revisão, ensaios pré-clínicos e clínicos;

- Língua inglesa;
- Relacionar tratamento e/ou prognóstico do adenocarcinoma pancreático e viroterapia;
- Abordar o *adenovírus*, o vírus *herpes simplex*, o *parvovirus* , o *reovírus*, o vírus da doença de Newcastle, o vírus do sarampo e o vírus *Vaccinia* como vírus oncolíticos.

Os critérios de exclusão foram os seguintes:

- Artigos que não originais, de revisão, ensaios pré-clínicos e clínicos;
- Línguas que não a inglesa;
- Artigos anteriores a janeiro de 2012;
- Artigos focados exclusivamente em tratamento cirúrgico ou por quimioterapia;
- Abordar o *adenovírus*, o vírus *herpes simplex*, o *parvovirus* , o *reovírus*, o vírus da doença de Newcastle, o vírus do sarampo e o vírus *Vaccinia* principalmente como agentes patológicos.

Os artigos foram selecionados a partir da leitura do título, do *abstract* e da introdução.

III – ADENOCARCINOMA PANCREÁTICO

O adenocarcinoma pancreático (ACP) é uma neoplasia maligna agressiva, com elevada taxa de proliferação e uma grande predisposição para invasão local e metastização. [2]

A sua oncogénese é descrita como uma sequência de transformações citológicas em cadeia à qual se associa uma acumulação de mutações genéticas adquiridas. [6] As alterações iniciam-se no tecido pancreático normal a partir de lesões pré-neoplásicas e pré-invasivas: as PanIN (*pancreatic intraepithelial neoplasia* – neoplasia intraepitelial pancreática), que são lesões planas ou papilares que surgem nos pequenos ductos pancreáticos; as IPMN (*intraductal papillary mucinous neoplasms* – neoplasias papilares intraductais mucinosas), lesões papilares; e as MCN (*mucinous cystic neoplasms* – neoplasias císticas mucinosas) (Fig. 2). [6,17]

PanIN	Precursor mais frequente. Sem predomínio de sexo. Lesão plana ou papilar que surge nos pequenos ductos pancreáticos. Composta por células cubóides a colunares.
PanIN-1	PanIN-1A: plana. PanIN-1B: micropapilar. Lesão de baixo grau. Atipia citológica mínima.
PanIN-2	Frequentemente papilar. Lesão de baixo grau. Atipia citológica moderada: pleomorfismo e hiper cromasia nucleares e aumento do tamanho celular.
PanIN-3	Geralmente papilar, mas pode ser plana ou apresentar morfologia cribiforme. Lesão de grau elevado. Atipia citológica severa: perda de polaridade nuclear e necrose luminal.
IPMN	Sem predomínio de sexo. Lesão papilar produtora de mucina que surge nos ductos pancreáticos principais ou nos seus ramos. Pode levar à dilatação dos ductos envolvidos, mas é mais frequente quando afeta o ducto principal.
MCN	Precursor menos frequente. Quase exclusivo do sexo feminino. Lesão cística produtora de mucina, quase sempre solitária. Sem relação com os ductos pancreáticos. Caracteriza-se por ter estroma ovário-like.

Figura 2 – Lesões precursoras do adenocarcinoma pancreático. Adaptado de [17,19,20]

Embora qualquer uma delas possa originar ACP, as PanIN são 13 a 100 vezes mais comuns do que as IPMN ou MCN. [18] As PanIN apresentam, ao longo do tempo, graus crescentes de atipia citológica (**Fig. 2**) [17] e um potencial de malignização crescente, evidenciado pelo fato de haver aumento da sua prevalência e aumento da incidência com a idade, o fato de se encontrarem com frequência fisicamente próximas do tumor em peças excisadas e de se verificar uma omnipresença destas lesões em tecidos pancreáticos de indivíduos com forte história familiar de ACP. Por outro lado, embora se possa encontrar PanIN de baixo grau em pâncreas saudáveis, as PanIN-3 são quase exclusivamente encontradas em doentes com ACP invasivo. [19]

A genética do ACP é bem conhecida e sabe-se que os genes mais frequentemente envolvidos são o proto-oncogene *KRAS* (cromossoma 12) e os genes supressores tumorais *CDKN2A* (cromossoma 9), *TP53* (cromossoma 17) e *SMAD4* (cromossoma 18) (**Fig. 3**). [20] As alterações génicas são muito variadas, podendo tratar-se de amplificações, deleções, substituições, translocações ou inversões. [10]

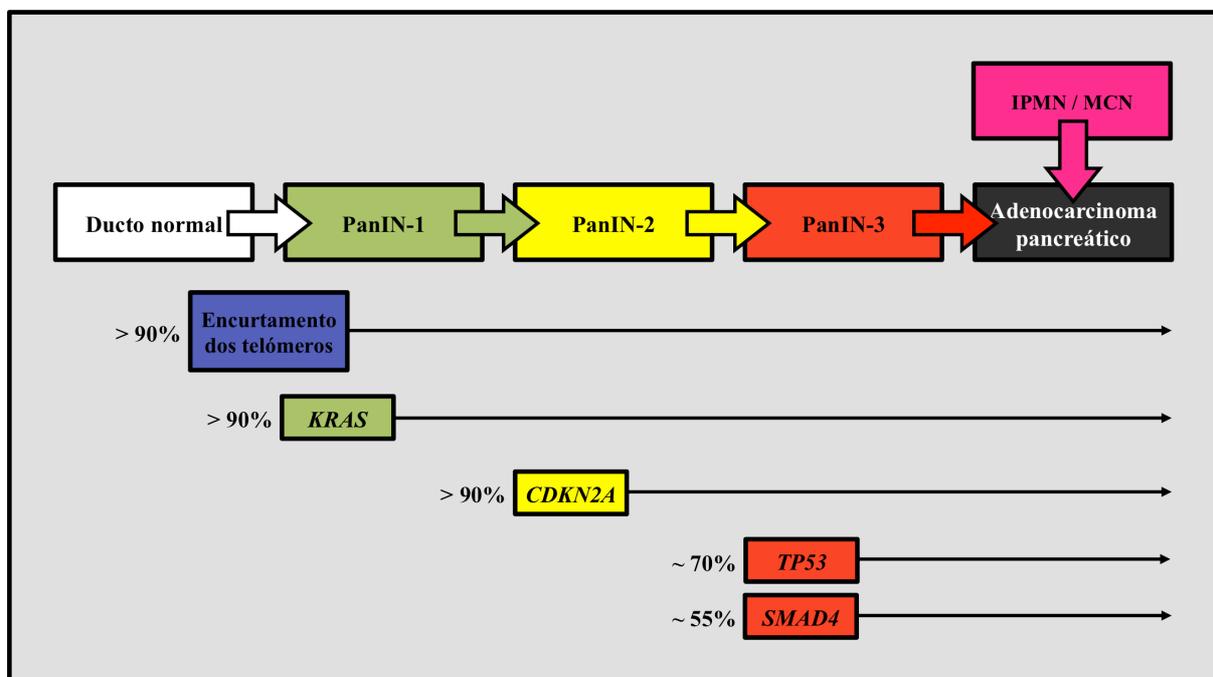


Figura 3 – Oncogénese do adenocarcinoma pancreático. Adaptado de [17,20].

A ativação do proto-oncogene *KRAS* está presente em mais de 90% dos casos de ACP. [20] Este gene codifica uma proteína guanosina trifosfato (GTP)-*binding*, mediadora de várias funções celulares, nomeadamente proliferação, divisão e sobrevivência celulares e expressão génica. Em células normais, a forma ativa da proteína é desativada por uma GTPase que hidrolisa o GTP em GDP (guanósina difosfato). [10,18]

A mutação ocorre mais frequentemente ao nível do codão 12 e leva à substituição da glicina por ácido aspártico, valina, arginina ou serina na proteína final, gerando uma proteína que se torna insensível à atividade intrínseca da GTPase. [21] O resultado é a ativação constitutiva da proteína *KRAS*, independentemente de sinalização intra ou extra celular. É uma das mutações mais precoces, podendo ser detetada desde as lesões PanIN-1. [18]

O gene supressor tumoral *CDKN2A* também se encontra mutado em mais de 90% dos casos de ACP. [6] A sua inativação ocorre por deleção homocigótica, perda do segundo alelo ou por silenciamento epigenético do promotor. A proteína codificada, por se tratar de um inibidor das CDKs (*cyclin-dependent kinase* – cinase dependente de ciclina), quando funcional impede a progressão da transição G1-S do ciclo celular, processo mediado principalmente pelas CDK4 e CDK6. [10] A inativação do *CDKN2A* também ocorre precocemente, mas após a mutação no *KRAS*, sendo detetada a partir das lesões PanIN-2. [6]

A inativação do gene supressor tumoral *TP53* ocorrem em aproximadamente 70% dos ACP, [10] quase sempre por mutação *missense* associada a perda do segundo alelo. O gene codifica a proteína p53, um regulador com um papel importante nos mecanismos de reparação do DNA (*deoxyribonucleic acid* – ácido desoxirribonucleico), regulação da transição G1-S, oposição à transição G2-M e indução da apoptose após lesão celular. A sua mutação ocorre mais tardiamente, não sendo geralmente detetadas mutações antes do estágio PanIN-3 [18,21] e a perda de função permite que a célula se divida, mesmo na presença de DNA danificado, permitindo a acumulação adicional de anomalias genéticas. [18]

Dos quatro genes supramencionados, o *SMAD4* é o que aparece mutado com menor frequência. Ainda assim, surge alterado em aproximadamente 55% dos casos de ACP e a sua inativação ocorre por deleção homozigótica ou por deleção de um alelo associada a mutação intragénica do segundo alelo. [18,21] O gene codifica uma proteína integrante da sinalização TGF- β (*transforming growth factor beta* – fator de transformação do crescimento beta), envolvida no crescimento e diferenciação celulares, [10] pelo que a sua mutação resulta na perda da supressão tumoral por esta via. [21] Tal como no *TP53*, a sua inativação ocorre mais tardiamente, no estágio PanIN-3. [18]

As IPMN e as MCN estão pior estudadas que as PanIN, mas sabe-se que ambas apresentam, ainda que menos frequentemente que as PanIN, mutações nos genes *KRAS*, *TP53*, [22] *CDKN2A* e *SMAD4* [21] e outras mutações, distintas das PanIN. Nas IPMN, ocorre inativação dos genes *STK11/LKB1* e *RNF43* e ativação do oncogene *GNAS*. O *STK11/LKB1* [cromossoma 19 [20]] é responsável por funções importantes ao nível do metabolismo, polaridade celular e apoptose, [22] enquanto que a proteína codificada pelo *RNF43* (cromossoma 17) participa na via de sinalização Wnt. A ativação do *GNAS* (cromossoma 20, codão 201) resulta na síntese autónoma de adenosina monofostato cíclico e consequente sinalização desgovernada do crescimento celular. Nas MCN, o gene mais frequentemente mutado é o *KRAS*, [21] sendo que o *RNF43* também aparece mutado, mas nunca o *GNAS*. [22]

Na oncogénese do ACP está ainda envolvido um outro processo: o encurtamento do telómeros. Os telómeros são constituídos por repetições em tandem da sequência 5'-TTAGGG-3' (T – timina; A – adenina; G – guanina) [18] localizadas na região terminal dos cromossomas. A sua função é prevenir a degradação dos cromossomas e a fusão das suas extremidades. Numa célula normal, por consequência de ciclos replicativos sucessivos, ocorre

um encurtamento destas estruturas e conseqüentemente, perda de função, o que despoleta mecanismos de reposta ao DNA danificado e, em última instância, apoptose. [23]

Porém, verifica-se que os telómeros curtos se encontram presentes em todos os estádios PanIN e conseqüentemente no ACP, ainda que paradoxalmente se verifique também uma ativação da expressão de telomerase. Estas extremidades cromossômicas tornam-se “pegajosas” e por intermédio de ciclos de fusão-ponte-quebra (**Fig. 4**), levam a alterações genéticas, como por exemplo, ampliações ou deleções. [18]

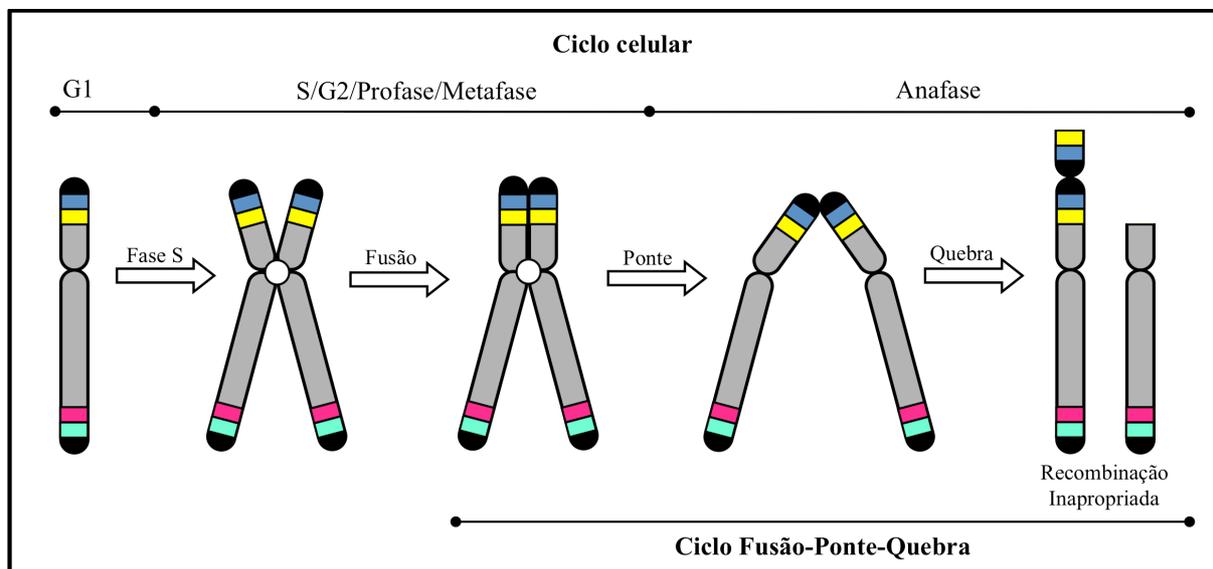


Figura 4 – Ciclos fusão-ponte-quebra. Adaptado de [23].

Estes ciclos iniciam-se com a formação de uma ligação covalente entre os cromatídeos-irmãos (fusão), originados durante a fase S do ciclo celular. Durante a divisão mitótica, mais precisamente durante a anafase, fase em que se dá o rompimento do centrómero, forma-se uma ponte à custa dessa ligação covalente. Com o avançar da mitose, o afastamento dos cromatídeos leva à quebra cromossômica e recombinações genéticas anormais, predispondo o material genético ao ciclo vicioso. Com o decorrer dos ciclos, o aumento da expressão da telomerase ajuda a estabilizar os cromossomas erráticos, permitindo a continuação do processo de malignização. [23]

Este modelo sequencial foi verificado em modelos animais, nos quais a progressão para malignidade requereu mutação no *KRAS* e a perda de, pelo menos, um gene supressor tumoral. [11] Foram também descobertas doze vias de sinalização principais, habitualmente desreguladas no ACP, estando esta disfunção relacionada com os genes supramencionados em dois terços dos tumores estudados (Fig. 5). [20]



Figura 5 – Principais vias de sinalização desreguladas no adenocarcinoma pancreático. Adaptado de [18,20].

Os miRNA (*micro ribonucleic acid* – micro ácido ribonucleico) são outros intervenientes que estão implicados no início e progressão do ACP. [24] Estes reguladores pós-transcricionais da expressão génica são pequenas moléculas de RNA não codificante com cerca de 22 nucleótidos de comprimento, sintetizadas no núcleo e no citoplasma. [24,25] Apresentam uma atividade reguladora vasta, abrangendo virtualmente todos os processos biológicos como o ciclo celular, diferenciação celular, sobrevivência, proliferação e apoptose. [25] Os miRNA podem ter função oncogénica ou supressora tumoral e, quando estão respetivamente sobre ou subexpressos de forma anormal, podem levar ao desenvolvimento da PanIN e do ACP. Os miRNA miR-10b, miR-21, miR-23a, miR-100, miR-155, miR-196a e miR-221/222 estão

mais frequentemente sobreexpressos e os miRNA miR-34a, miR-148a, miR-217 e miR-375 estão mais frequentemente subexpressos (**Tabela 3**). [24]

Tabela 3 – miRNAs mais frequentemente desregulados no adenocarcinoma pancreático
Adaptado de [25].

Expressão celular	miRNA	Funções
S o b r e e x p r e s s o s	miR-10b	Invasão
	miR-100	Proliferação celular e metastização
	miR-155	Proliferação celular, invasão e capacidade de migração
	miR-196a	Proliferação celular e invasão
	miR-21	Proliferação celular, metastização e quimioresistência
	miR-221/222	Proliferação celular, sobrevivência, invasão, capacidade de migração e metastização
	miR-23a	Proliferação celular
S u b e x p r e s s o s	miR-148a	Supressão da metastização
	miR-217	Supressão do crescimento celular
	miR-34a	Apoptose e supressão da progressão do ciclo celular e da capacidade de migração
	miR-375	Supressão da progressão do ciclo celular

miRNA – *micro ribonucleic acid*, micro ácido ribonucleio

O microambiente do ACP assume um carácter importante na resistência à terapia convencional [11] e na agressividade do tumor, tendo um papel-chave nas capacidades invasivas e processos metastáticos. [2] A massa tumoral é composta maioritariamente (entre 50 e 80%) por tecido fibrótico e células imunes (na sua maioria, imunossupressoras, como as células reguladoras T e células supressoras derivadas da linhagem mielóide), [1,11] vasos sanguíneos e uma densa matriz extracelular, [9,26] composta por proteínas, polissacarídeos, fatores de crescimento e citocinas, [7] tanto pró-inflamatórias como anti-inflamatórias. As citocinas pró-inflamatórias [interleucinas 1 β , 6 e 8, TNF- α (*Tumor Necrosis Factor Alpha* –

fator de necrose tumoral alfa) e MIF (*Macrophage Migration Inhibitory Factor* – fator inibidor de migração de macrófagos)] possuem um papel importante na proliferação, migração, invasão e angiogênese tumorais, enquanto que as anti-inflamatórias (TGF- β e interleucina 10) estão envolvidas na tolerância e evasão ao sistema imune. [19]

Contribuem ainda para a sua composição células pancreáticas estreladas, [26] que se têm vindo a revelar como uma componente essencial e determinante do microambiente tumoral (Fig. 6). [11]

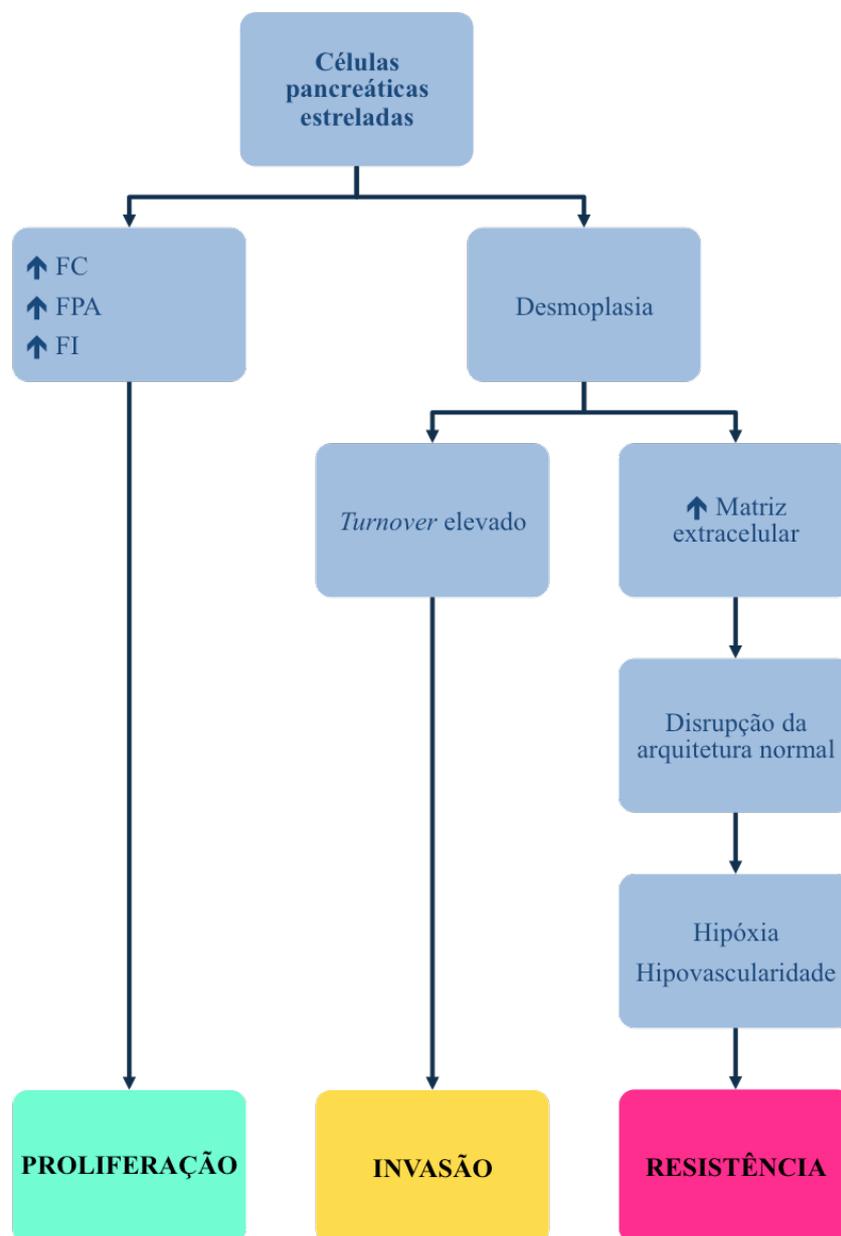


Figura 6 – Papel das células pancreáticas estreladas no microambiente tumoral do adenocarcinoma pancreático. FC – Fatores de crescimento | FPA – Fatores pró-angiogénicos | FI – Fatores invasivos

As células estreladas pancreáticas foram identificadas pela primeira vez em pâncreas saudáveis e sabe-se que sob condições normais são células dormentes, cuja função fisiológica ainda está por determinar. [7] No ACP, no entanto, são os fibroblastos predominantes no estroma [19] e sobreexpressam fatores de crescimento e/ou os seus recetores, assim como fatores pró-angiogénicos e fatores invasivos (**Tabela 4**), em parte responsáveis pela proliferação agressiva do tumor. [2]

Tabela 4 – Fatores sobreexpressos pelas Células Pancreáticas Estreladas

Adaptado de [2].

Crescimento (e/ou seus recetores)	Pró-angiogénicos	Invasivos
EGF	VEGF	Metaloproteínas
NGF	FGF	Ativador de plasminogénio
Gastrina	PDGF	tecidual

EGF – *epidermal growth factor*, fator de crescimento epidérmico | **NGF** – *nerve growth factor*, fator de crescimento nervoso | **VEGF** – *vascular endothelial growth factor*, fator de crescimento do endotélio vascular | **FGF** – *fibroblast growth factor*, fator de crescimento de fibroblastos | **PDGF** – *platelet derived growth factor*, fator de crescimento derivado de plaquetas.

Por outro lado, as células estreladas, que têm uma elevada taxa de *turnover*, desencadeiam desmoplasia (produção de tecido conjuntivo), responsável pelo carácter tumoral invasivo. [9]

A densificação da matriz altera a estrutura normal do pâncreas, dos vasos sanguíneos e dos vasos linfáticos, que resulta num ambiente hipovascular e hipóxico. [7,11] A nova estrutura, juntamente com pressões intersticiais elevadas, resultantes da presença de ácido hialurónico, que tem uma grande capacidade de retenção de água, cria uma barreira física que torna o ACP inacessível a fármacos, nomeadamente sistémicos. Acresce ainda o fato de as células estreladas exprimirem a proteína ativadora de fibroblastos α , que permite a adaptação do tumor ao hospedeiro, implementando mecanismos de potenciação da desmoplasia e fuga à vigilância imune. [26]

Dadas as condições de hipoxia, o ACP recorre à reformatação das suas vias metabólicas, de forma a conseguir produzir energia suficiente para os processos de biossíntese. [6] O mais

comum é a ativação constitutiva da glicólise que requer um aumento da expressão de recetores para a glicose e para o ácido láctico, para que haja respetivamente um aumento de aporte de substrato e de excreção do subproduto potencialmente tóxico. No entanto, uma vez que a hipovascularidade implica uma menor disponibilidade de nutrientes, a célula tumoral recorre também a métodos alternativos para a sua obtenção, nomeadamente autofagia de conteúdo citoplasmático e pinocitose de matriz extracelular. [27]

A investigação de mecanismos de ultrapassagem dos obstáculos resultantes do microambiente assume-se assim como uma estratégia promissora para a melhoria da distribuição e eficácia das terapias citotóxicas bem como dos vectores oncolíticos, nomeadamente vírus. [11]

IV – VIROTERAPIA

1. INTRODUÇÃO HISTÓRICA

O conceito de viroterapia existe há mais de um século. As primeiras referências clínicas relativas a vírus oncolíticos (VO) surgiram após a observação de regressão tumoral (geralmente leucemias ou linfomas) após infecção viral sistêmica natural ou por vacinação. O primeiro caso descrito remonta a 1904, [16] que relata a história de uma doente de 42 anos com leucemia mielóide crônica na qual se verificou uma diminuição marcada dos leucócitos após doença “tipo gripe”, presumivelmente infecção por *Influenza*. [15,16] Um outro caso descreve um rapaz com 4 anos de idade com leucemia que passou por uma fase de remissão após infecção por varicela. [15]

Ao longo dos anos, foram sendo observados casos semelhantes com diferentes neoplasias (incluindo linfomas, tumores sólidos, melanoma e mieloma múltiplo) e com vírus diferentes, nomeadamente o vírus da raiva (*Lissavirus*), o *Adenovirus*, o *Parvovirus* e o vírus da doença de Newcastle (*Paramyxoviridea*, *Avulavirus*). [16]

Depois de experiências *in vitro* terem demonstrado que os vírus podiam infetar, replicar-se dentro de células tumorais e lisá-las, [1] foram conduzidos, principalmente entre 1950 e 1970, vários ensaios clínicos com VO visando o tratamento do cancro. No entanto, acabaram por ser considerados inúteis como agentes terapêuticos [12] devido à elevada toxicidade, por afetarem também células saudáveis, e à limitada eficácia por falta de especificidade tumoral e por serem rapidamente neutralizados pelo organismo. [15] Estes dois fatores eram secundários à falta de métodos que permitissem controlar a virulência, mantendo a capacidade replicativa. [12]

A sucessão de ensaios clínicos com resultados desapontantes levou ao desvanecimento de interesse pela viroterapia como tratamento tumoral [15] até ao início dos anos 90, quando surge o conceito de VO geneticamente modificado. [10,28]

No seguimento de experiências realizadas para uma melhor compreensão das áreas de imunologia oncológica e engenharia genética, [1] em 1991, um *Herpes simplex virus* tipo 1 geneticamente modificado ao nível do gene que codifica a timidina cinase é testado em laboratório, verificando-se replicação seletiva em células tumorais, o que reabre as portas para a viroterapia. Em 2005, é aprovado na China o primeiro VO para tratamento de neoplasia (tumores da cabeça e pescoço), o *Adenovirus* geneticamente modificado H101, sendo 10 anos depois aprovado nos Estados Unidos da América o *Herpes simplex virus* geneticamente modificado T-vec (*Talimogene laherparepex*) para o tratamento do melanoma em estágio avançado ou não ressecável. Na União Europeia e na Austrália, é aprovado em 2016. [12]

Os marcos históricos da viroterapia encontram-se resumidos na Fig. 7.

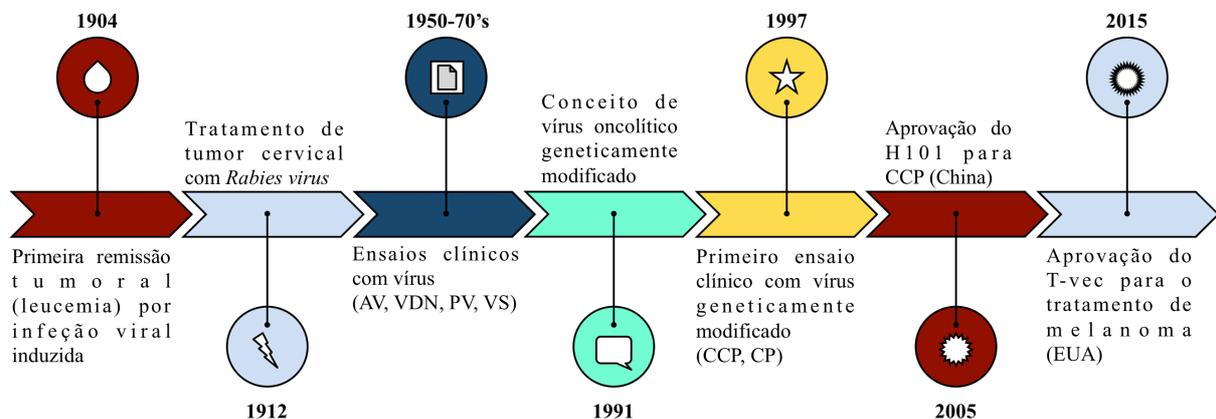


Figura 7 – Marcos históricos da viroterapia. Adaptado de [12,16].

AV – *Adenovirus* | **CCP** – cancros da cabeça e pescoço | **CP** – cancro pancreático | **EUA** – Estados Unidos da América | **H101** – *Adenovirus* geneticamente modificado | **PV** – *Parvovirus* | **T-vec** – *Talimogene laherparepex* (*Herpes simplex virus* geneticamente modificado) | **VDN** – vírus da doença de Newcastle | **VS** – vírus do sarampo

2. VÍRUS ONCOLÍTICOS

Os VO podem ser vírus de DNA ou de RNA, de cadeia simples ou dupla, e infetam as células após ligação aos seus recetores de superfície ou por fusão direta com a sua membrana plasmática. [28] Os vírus mais profundamente abordados neste trabalho encontram-se na

Tabela 5.

Tabela 5 – Vírus oncolíticos

Adaptado de [15].

Vírus de DNA				
	AV	HSV	PV	VV
Família	<i>Adenoviridae</i>	<i>Herpesviridae</i>	<i>Parvoviridae</i>	<i>Poxviridae</i>
Genoma	dsDNA	dsDNA	ssDNA	dsDNA
Método de entrada	RCA	MEHV Nectina 1 ou 2	Resíduos de ácido siálico	Macropinocitose
Local de replicação	Núcleo	Núcleo	Núcleo	Citoplasma
Vírus de RNA				
	RV	VS	VDN	VSV
Família	<i>Reoviridae</i>	<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Paramyxoviridae</i>
Genoma	dsRNA	(-)ssRNA	(-)ssRNA	(-)ssRNA
Método de entrada	MAJA	MSAL CD46	Endocitose Fusão direta	RLBD
Local de replicação	Citoplasma	Citoplasma	Citoplasma	Citoplasma

AV – *Adenovirus* | **DNA** – *deoxyribonucleic acid*, ácido desoxirribonucleico | **dsDNA** – *double-stranded DNA*, DNA de dupla cadeia | **ssDNA** – *single-stranded DNA*, DNA de cadeia simples | **HSV** – *Herpes simplex virus* | **MAJA** – molécula de adesão juncional A | **MEHV** – mediador de entrada de *Herpes simplex* | **MSAL** – molécula de sinalização de ativação linfocítica | **PV** – *Parvovirus* | **RCA** – recetor *coxsackie-adenovirus* | **RLBD** – recetor lipoproteico de baixa densidade | **RNA** – *ribonucleic acid*, ácido ribonucleico | **RV** – *Reovirus* | **VDN** – vírus da doença de Newcastle | **VS** – vírus do sarampo | **VSV** – *Vesicular stomatitis virus* | **VV** – *Vaccinia virus* | (-) – senso negativo (cadeia de DNA ou RNA complementar a uma cadeia de DNA codificante)

3. MECANISMOS ANTITUMORAIS DOS VÍRUS ONCOLÍTICOS

As células tumorais apresentam vias de sinalização celulares erráticas que lhes permite escapar ao controlo do organismo. No entanto, algumas dessas alterações (**Fig. 8**) deixam-nas vulneráveis à infeção viral, uma vez que criam um ambiente propício à replicação viral. [29]

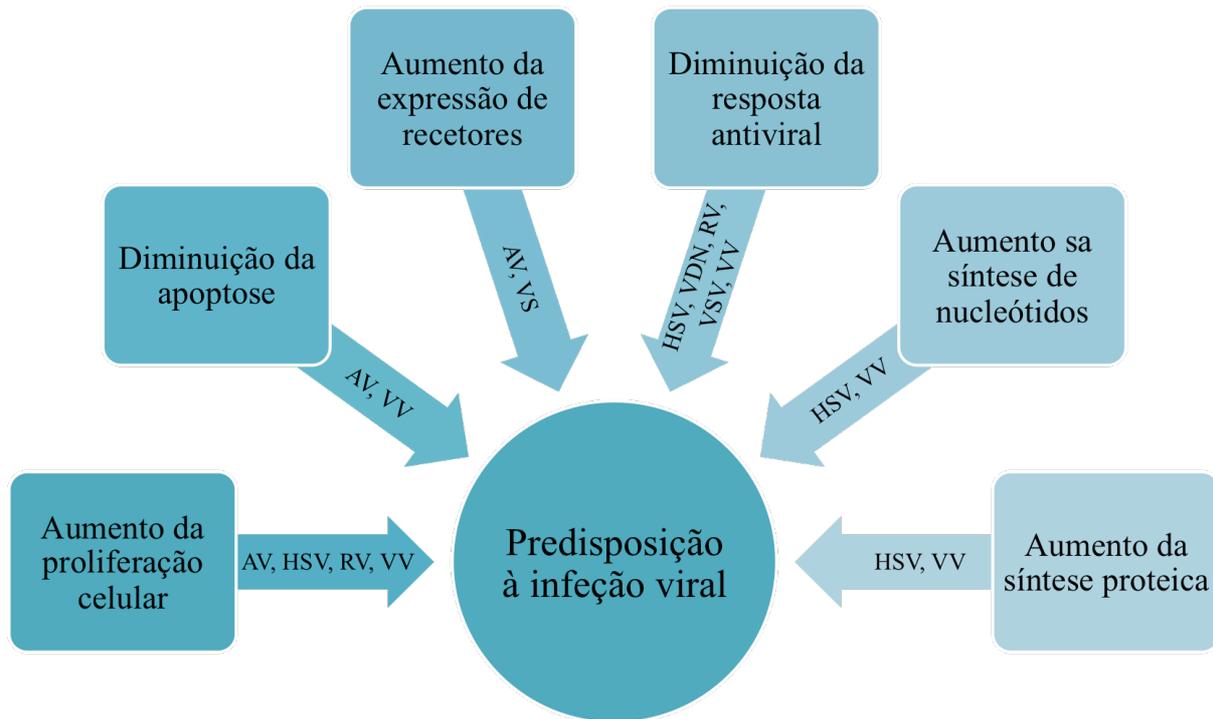


Figura 8 – Fatores que predisõem a célula tumoral à infeção viral. Adaptado de [29].

AV – Adenovirus | **HSV** – Herpes simplex virus | **RV** – Reovirus | **VDN** – vírus da doença de Newcastle | **VS** – vírus do sarampo | **VSV** – Vesicular stomatitis virus | **VV** – Vaccinia virus

Após a infecção, os VO podem aniquilar as células tumorais por vários mecanismos (**Fig. 9**).

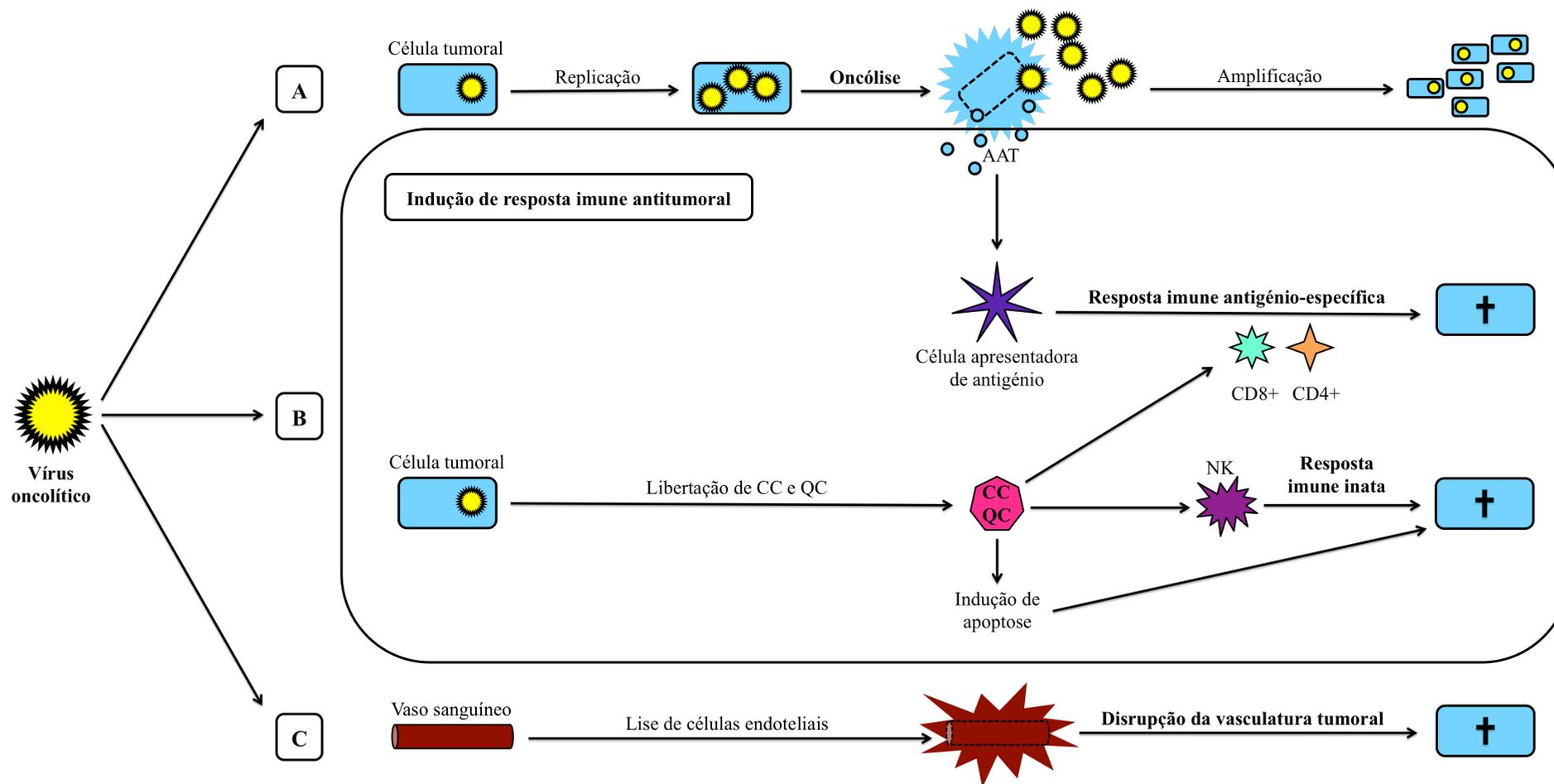


Figura 9 – Mecanismos antitumorais dos vírus oncolíticos. Adaptado de [13,30]. O vírus pode desencadear a morte celular por A) lise direta, B) indução de resposta imune antitumoral antígeno-específica ou inata e C) indução de ruptura da vasculatura tumoral.

AAT – antígeno associado ao tumor | CC – citocinas | CD4+/CD8+ – linfócitos T | NK – linfócito *natural killer* | QC – quimiocinas

O primeiro mecanismo é inerente ao seu nome – a oncolise (**Fig. 9A**). A oncolise pode ser um atributo natural do vírus ou resultado de manipulação genética. [28] O vírus infeta a célula tumoral, replicando-se múltiplas vezes até que culmina na lise celular direta. [16,30] Daí decorre a libertação de mais vírus que poderão infectar células tumorais vizinhas (amplificação), [13] efeito que se mantém funcional até que haja neutralização viral por parte do organismo ou redução do número de células suscetíveis à infecção. [17]

Um outro mecanismo reside na indução de resposta imune antitumoral (**Fig. 9B**) A infecção leva à estimulação da produção e libertação de citocinas e quimiocinas, tais como o TNF- α (*Tumor Necrosis Factor Alpha* – fator de necrose tumoral alfa), TRAIL (*TNF-related Apoptosis Inducing Ligand* – ligando indutor de apoptose relacionado com o TNF), interferão tipo 1 e interleucinas; os próprios vírus podem ativar vias de sinalização que levam à produção dessas citocinas e quimiocinas. Estes imunomoduladores são capazes de induzir apoptose só por si, mas são também conseguem recrutar e ativar células imunes inatas, como os linfócitos NK (*Natural Killer*), neutrófilos e macrófagos, e adaptativas como os linfócitos T (CD4+, CD8+) [30] que podem levar à morte das células tumorais.

Concomitantemente, é possível que haja a libertação de PAMP *molecules* (*pathogen-associated molecular pattern signals* – sinais de padrões moleculares associados a patogénios) e DAMP *molecules* (*damage-associated molecular pattern signals* – sinais de padrões moleculares associados a danos). As PAMP consistem em partículas virais, como cápsides, material genético e proteínas, e as DAMP são proteínas da célula hospedeira, neste caso, da célula tumoral. Estas últimas ativam recetores como os TLR (*toll-like receptors* – recetores *toll-like*), presentes nas células imunes inatas [1] e já foram associadas à libertação de perforinas citotóxicas. [15] Todos estes fatores são passíveis de ser letais e pode originar o *bystander effect* (efeito de espetador), isto é, destruição de células tumorais não infectadas vizinhas. [30]

O mecanismo exato de desencadeia a estimulação imunitária permanece desconhecido, [16] mas sabe-se que esta estimulação é temporária, uma vez que contribui igualmente para a *clearance* viral (melhor explicado no subcapítulo seguinte “LIMITAÇÕES”). [30]

A lise celular desencadeada pela oncolise liberta ainda antígenos associados ao tumor, [15,16] que englobam proteínas mutadas, proteínas de fusão e/ou proteínas específicas do tumor sobreexpressas. [15] Estes antígenos são processados pelas células apresentadoras de antígeno, que depois os “apresentam” aos linfócitos T ativando-os e tornando-os competentes para o extermínio de células tumorais. [30] Esta resposta imune pode ser local e sistêmica, [16] o que foi confirmado pela existência de atividade antitumoral à distância em locais não infectados por vírus. [15]

Alguns vírus são capazes de destruir indiretamente o tumor sem que ocorra infecção das células tumorais. Neste caso, os vírus atacam os vasos sanguíneos tumorais (**Fig. 9C**) [31] e a agressão resulta em trombose vascular [28] e/ou alteração da vasculatura tumoral, com diminuição do fluxo sanguíneo e da oxigenação na região peri-tumoral, o que leva à morte celular. [13]

4. LIMITAÇÕES

São vários as condicionantes que podem representar fatores limitantes à eficácia da viroterapia, entre eles a seletividade viral, o microambiente tumoral, a neutralização viral, o modo de administração e a resistência à terapêutica.

4.1. Seletividade

VO como o *Vaccinia virus* ou o vírus da doença de Newcastle não se ligam a recetores específicos, infectando as células por endocitose, [32] mas alguns vírus são naturalmente capazes de infectar mais seletivamente as células tumorais do que células saudáveis, [11,15] ao

explorarem, por exemplo, vias de sinalização aberrantes ou recetores de superfície sobreexpressos. [14] O *Adenovirus*, por exemplo, liga-se a recetores *coxsackie-adenovirus* e o *Herpes simplex virus* liga-se a mediadores de entrada do *Herpes simplex* ou a nectinas (proteínas de adesão celular) (**Tabela 5**). No entanto, apesar de se observar uma tendência para aumento da expressão de alguns destes recetores em células tumorais, estes não deixam de ser expressos por células normais. [32] De forma a contornar o problema, podem ser seleccionadas estirpes não virulentas na espécie humana [12] ou pode-se recorrer à modificação viral (ao nível do genoma e/ou da cápside) [32] de forma a estabelecer ou intensificar este tipo de seletividade. No caso do ACP, o *Reovirus* parece ser um agente apelativo uma vez que se replica preferencialmente em células com a via de sinalização KRAS ativa, [1] tendo uma virulência limitada em células humanas normais. [12] Os vírus podem ainda ser programados de forma a que a sua replicação se dê perante um promotor apenas presente em células tumorais [33] ou sob o controlo de miRNAs que estejam subexpressos em células tumorais. [32]

4.2. Microambiente

Como referido anteriormente, o microambiente do ACP é rico em matriz extracelular e possui elevadas pressões intersticiais que dificultam a chegada de agentes sistémicos à massa tumoral e suas metástases. A administração intratumoral dos vírus permitiria anular esta contrariedade, mas dada a escassez de células pancreáticas tumorais propriamente ditas, a distribuição continuaria a ser um problema, assim como o fenómeno de amplificação terapêutica. [1] Por outro lado, ambientes tumorais altamente displásicos dificultam o dispersar de pequenas partículas no local de administração. Recentemente, agentes antifibróticos, como por exemplo a relaxina, demonstraram potenciação do aumento da penetração tumoral. [32]

4.3. Neutralização

Os vírus que constituem causas naturais de infecção são, à partida, mais vulneráveis à neutralização por parte do organismo, [12] que rapidamente faz cessar a replicação viral seja por mobilização de células imunes inatas, como os neutrófilos, macrófagos e linfócitos NK, [34] ou por intermédio de anticorpos. [27,30] A neutralização poderá ser assim um fator limitante à administração endovenosa de agentes virais em doentes que já tenham sido infetados ou vacinados. [12,28] O *Adenovirus* e o *Reovirus* são os têm uma maior probabilidade de ser neutralizados pelo sistema imunitário, [1] sendo que quase 90% das pessoas têm anticorpos contra o último. [28] O *Herpes simplex virus* que se propaga célula à célula não será tão facilmente eliminado pelos anticorpos, [1] apesar de 50-80% dos indivíduos possuírem anticorpos anti-HSV. [28] Possíveis soluções passariam pela administração viral intratumoral, pela imunossupressão numa fase inicial de tratamento, desde que não interferisse com a atividade antitumoral nem colocasse em risco a segurança terapêutica, [34] e/ou pelo encapsulamento dos vírus com polímeros, nanopartículas biodegradáveis ou lipossomas. [33]

4.4. Administração

Em estudos pré-clínicos, verificou-se que os agentes virais quando administrados por via endovenosa conseguiam chegar com êxito às metástases à distância e que as barreiras físicas tumorais podiam ser ultrapassadas pela administração de doses crescentes, [35] pelo que idealmente a administração dos VO far-se-ia por esta via. No entanto, a opsonização (cobertura por anticorpos ou outras substâncias do soro) das partículas virais torna-as mais facilmente reconhecíveis pelo sistema mononuclear fagocítico do fígado e do baço, locais onde ficam retidas e são posteriormente fagocitadas, muito antes de chegar ao local-alvo. [31] Em alternativa, poder-se-ia colocar como hipótese a administração intratumoral, mas como

limitação principal tem o fato de apenas uma minoria dos tumores ser facilmente acessível. [28] Portanto, a administração eficiente destes agentes ainda constitui um desafio. No entanto, a modificação das cápsulas virais com biomateriais vem demonstrando poder vir a ajudar a diminuir a sequestração periférica. [31]

4.5. Resistência

A exposição continuada a VO pode levar à indução de mecanismos de resistência nas células tumorais que impeçam a infecção e replicação virais, nomeadamente subexpressão de recetores membranares. O ACP é capaz de diminuir a expressão dos recetores *coxsackie-adenovirus*, por exemplo, ou de sobreexpressar CEACAM6 (*carcinoembryonic antigen-related cell-adhesion molecule 6* – molécula de adesão celular relacionada com antigénio carcinoembrionário 6), mecanismos que inibem o transporte viral para o núcleo. Bloquear a via de sinalização que possibilita essa subexpressão e induzir o *knockdown* (redução da expressão) do gene que codifica a CEACAM6 permite reverter este estado de resistência. [1]

5. ENSAIOS CLÍNICOS

A variedade de VO disponíveis proporciona a abertura de uma grande janela de oportunidades terapêuticas, [13] que se espelha na tendência crescente de realização de estudos de investigação. [34] No entanto, a projeção e execução de novos ensaios clínicos requerem que sejam tidos em conta alguns aspetos (**Fig. 10**).

A dose máxima tolerada de alguns vírus não é atingida por causa da *clearance* ou da elevada tolerância virais. [34]

Os vírus *wild-type* são genericamente mais potentes. Os de primeira geração foram modificados de forma a atenuar a sua virulência com o intuito de melhorar a segurança

terapêutica, mas houve diminuição da potência oncolítica. As próximas gerações estão a ser concebidas para que haja uma maior segurança com manutenção da potência antitumoral. [33]

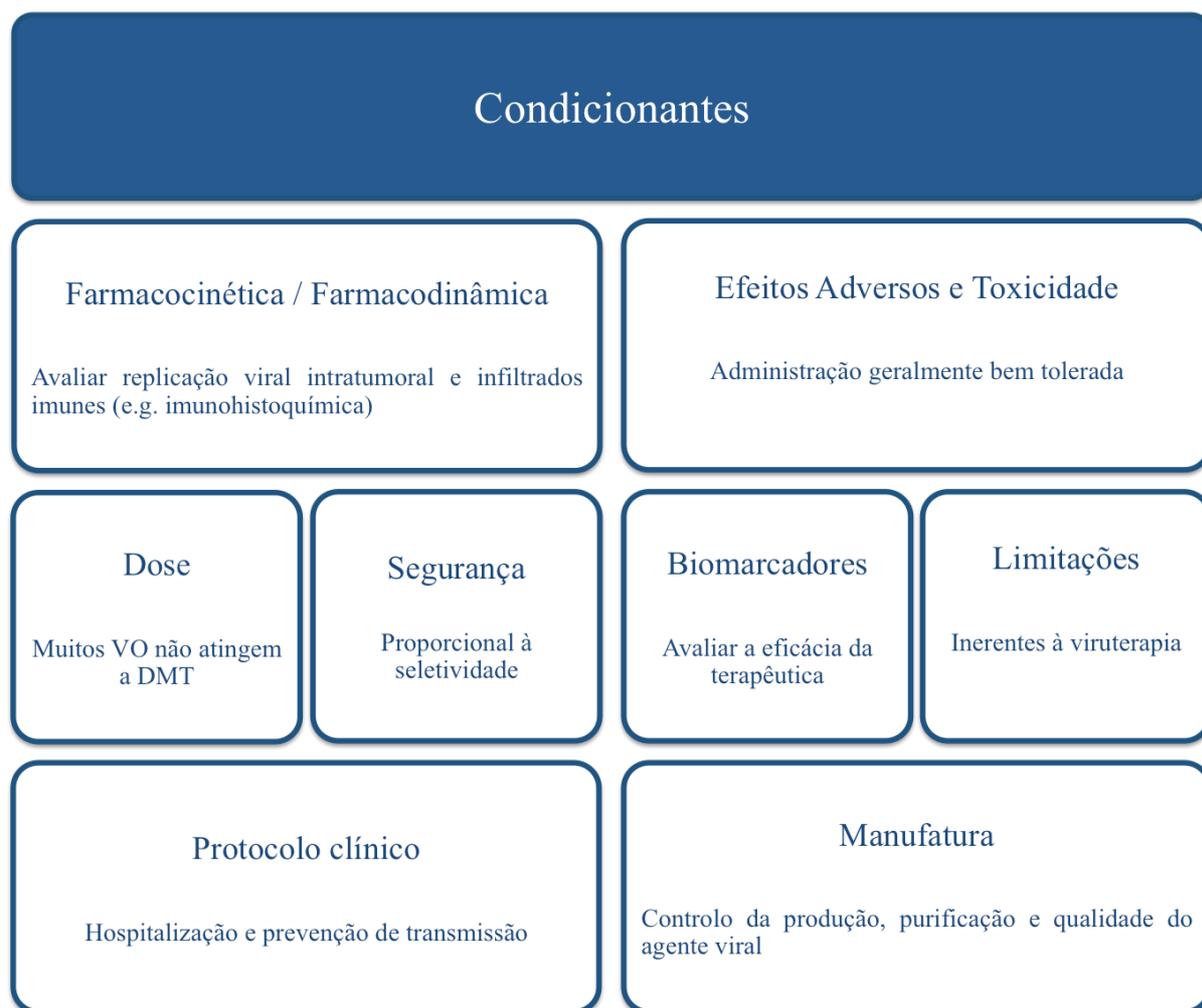


Figura 10 – Aspectos a ter em conta durante a projeção e execução de ensaios clínicos. Adaptado de [13,34].
DMT – dose máxima tolerada | VO – virus oncolíticos

A segurança e eficácia de agentes virais utilizados isoladamente ou em associação com quimioterapia e/ou radioterapia estão a ser estudadas em vários ensaios [15] uma vez que já foram relatados alguns casos de morte associadas à viroterapia. Quanto aos efeitos adversos e toxicidade, estes podem ser consequências inesperadas das modificações genéticas ou da adaptação/evolução viral, mas de uma forma geral, apenas estão relatados síndromes “tipo gripe”, de maior intensidade se administrados sistemicamente. [34]

Os ensaios clínicos com VO em curso encontram-se resumidos na **Tabela 6**.

Tabela 6 – Ensaios clínicos

Adaptado de [15,35].

Vírus de DNA				
	AV	HSV	PV	VV
Ensaios clínicos (fase)	I-III	I-III	I-II	I-III
Neoplasias-alvo	Cancro pancreático*, cancros da cabeça e pescoço, cancro da mama, cancro colorretal, glioblastoma, cancro do ovário, cancro da bexiga, melanoma, carcinoma hepatocelular, cancro da próstata	Cancro pancreático*, cancros da cabeça e pescoço, cancro da mama, melanoma, carcinoma hepatocelular, cancro do pulmão, glioblastoma	Glioblastoma	Cancros da cabeça e pescoço, cancro da mama, melanoma, cancro colorretal, carcinoma hepatocelular, cancro do pulmão
Vírus de RNA				
	RV	VS	VDN	VSV
Ensaios clínicos (fase)	I-II	I-II	I-II	I
Neoplasias-alvo	Cancro pancreático*, cancros da cabeça e pescoço, cancro colorretal, cancro do ovário, melanoma, cancro do pulmão de células não pequenas, glioma, sarcoma	Cancro da mama, cancro do ovário, cancro da bexiga, melanoma, cancro da próstata	Glioblastoma, neuroblastoma, sarcoma	Carcinoma hepatocelular

AV – *Adenovirus* | **HSV** – *Herpes simplex virus* | **PV** – *Parvovirus* | **RV** – *Reovirus* | **VDN** – vírus da doença de Newcastle | **VS** – vírus do sarampo | **VSV** – *Vesicular stomatitis virus* | **VV** – *Vaccinia virus*

*Mais de 90% são adenocarcinomas pancreáticos. [25]

V – VIROTERAPIA NO ADENOCARCINOMA PANCREÁTICO

1. ADENOVIRUS

O *Adenovirus* (AV) oncolítico é um vírus profundamente estudado no contexto de terapia do cancro [36] e foi o primeiro a nível mundial a ser aprovado como agente antitumoral (tumores da cabeça e pescoço). [37] É um vírus prevalente na população mundial, capaz de provocar doença, ainda que ligeira a moderada (infecções respiratória, gastroenterites, cistites) em qualquer idade. Por isso, não surpreende que quase a totalidade da população humana seja seropositiva para anticorpos anti-AV, o que só por si impõe algumas limitações clínicas (maior *clearance* viral) à utilização deste vírus. Contudo, os AV são considerados de uma forma geral seguros [36] e vários ensaios clínicos já estabeleceram a sua tolerância. [38]

Os AV convencionais demonstraram uma eficácia muito restrita no combate ao ACP, [39] nomeadamente por especificidade e capacidade de infeção e propagação tumorais limitadas, o que exigiu melhorias no *design* e engenharia genéticos. [37,38]

O AV Delta-24-RGD é um vírus derivado do AV tipo 5 e à sua cápsula foi acrescentada o peptídeo RGD que permite a ligação viral a integrinas membranares. Em estudos pré-clínicos, este vírus demonstrou capacidade de oncólise e verificou-se que a sua administração levou ao aumento do infiltrado de macrófagos e linfócitos T assim como da produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias. [40] O Delta-24-RGD foi concebido para se replicar preferencialmente em células tumorais com anomalias ao nível da via de sinalização p16/RB/E2F, como é o caso do ACP, e a presença do peptídeo RGD permite que haja um aumento da sua capacidade de infeção independentemente dos recetores *coxsackie-adenovirus* (pouco expresso pelas células tumorais pancreáticas [38,39]). [41]

Dai *et al*⁴¹ estudaram os efeitos do Delta-24-RGD em doze linhagens celulares de ACP, seis clássicas (ASPC1, BxPC3, HPNE-tert, HS766T, MiaPaCa2 e PANC1) e seis primárias,

criadas pelo laboratório dos investigadores (MDA-PAT43, MDA-PATC50, MDA-PATC53, MDA-PATC66, MDA-PATC108 e MDA-PATC118). Por comparação com uma linhagem controlo positivo, que já tinha demonstrado ser sensível ao Delta-24-RGD, verificou-se que o Delta-24-RGD era capaz de induzir citotoxicidade em 50% das linhagens pancreáticas (três clássicas – ASPC1, MiaPaCa2 e PANC1; e três primárias – MDA-PATC53, MDA-PATC108 e MDA-PATC118), e que nem a expressão de p16 nem da proteína RB serviam de fatores preditivos de sensibilidade a estes vírus. No entanto, a expressão de ciclina D1 e CDK4 era superior nas células sensíveis. [41]

Paralelamente, o Delta-24-RGD induziu em todas as linhagens celulares a exposição de fosfatidilserina, uma proteína sinalizadora de fagocitose que normalmente se encontra na camada interna da membrana celular e que se exterioriza aquando da apoptose, pelo que os autores associaram à terapêutica viral anticorpos anti-fosfatidilserina, obtendo efeitos sinérgicos *in vivo*, superiores ao uso de viroterapia e anticorpos de forma isolada. [41]

Apesar de o Delta-24-RGD se revelar promissor, são necessários estudos que esclareçam como se processam os mecanismos de citotoxicidade e a exteriorização da fosfatidilserina de forma a otimizar as opções terapêuticas. [41]

O AV tipo 5 é o mais utilizado para criar AV oncolíticos, mas apresenta algumas desvantagens. A rápida *clearance* viral após administração endovenosa compromete a sua eficácia antitumoral e a sua replicação ao nível do fígado é capaz de gerar hepatotoxicidade severa. [36,37] Os estudos mencionados de seguida tiveram em conta estas contrariedades.

Armstrong *et al*³⁸ usaram mosaicos (híbridos virais provenientes de pelo menos duas estirpes) de AV tipo 5 aos quais foram adicionados recetores de AV tipo 3 e integrina RGD para aumentar a capacidade de infeção. Estes foram aplicados nas linhagens celulares de ACP ASPS1, S2VP10, S2013, HS766T, MiaPaCa2 e PANC1. *In vitro* e *in vivo*, os AV demonstraram aumento da capacidade de infeção e replicação seletiva, poupando os tecidos

normais, e propagação mantida. Os autores salientaram o AV 5/3Cox2CRAdΔE3ADP-IFN, que tinha como características adicionais a sobreexpressão de ADP e interferão que levavam respetivamente ao aumento da indução da apoptose e da atividade antitumoral direta e indireta. [38]

Na investigação de Takei *et al*⁴² visou-se apontar para os ACPs que tivessem alterações a nível do gene que codifica a p53, [42] o que acontece, como referido anteriormente, em cerca de 75% dos casos.

Foram usados quatro AV tipo 5, os respetivos mosaicos possuidores de recetor de AV tipo 35 e um AV tipo 5 com um gene p53 *wild-type* (AVp53), de forma isolada ou combinada. Três dos AV tipo 5 e o AVp53 demonstraram citotoxicidade nas linhagens de ACP ASPC1, BxPC3, MiaPaCa2 e PANC1. Não houve diferenças de eficácia entre AV tipo 5 e o respetivo mosaico, exceto num dos pares, em que o mosaico apresentava maior citotoxicidade, embora o mecanismo não tenha sido esclarecido. [42]

Por outro lado, verificou-se sinergismo entre as formas mosaico e o AVp53 nas células tumorais que tinham o gene para a p53 mutado ou ausente, havendo aumento da morte celular por apoptose. [42]

Kaliberov *et al*⁴³ optaram por construir e tentar validar uma estirpe mosaico de AV tipo 5 ao qual foi adicionado o recetor de AV tipo 3. Este mosaico foi depois modificado de modo a expressar um outro recetor que lhe conferisse replicação seletiva em células tumorais e modificado ao nível da cápside com o intuito de diminuir o tropismo hepático viral, e por conseguinte a toxicidade hepática. Foi testado em dois conjuntos de linhagens celulares de ACP, um sensível e outro resistente à gemcitabina, de forma a estudar a eficácia viral e a possibilidade de efeitos sinérgicos com a quimioterapia. Cada conjunto continha seis linhagens de ACP (MiaPaCa2, BxPC3, ASPC1, HS7665, Capan1 e HPAF-II) e três não pancreáticas. [43]

A modificação da cápside não alterou a estabilidade viral, e a administração do mosaico provou-se eficaz em termos de especificidade e replicação, quer *in vitro* quer *in vivo*, em ambas as populações, tendo sido também conseguida a diminuição do tropismo hepático. Nas linhagens resistentes à quimioterapia, verificou-se que quando comparada à gemcitabina isolada, a combinação *adenovirus*+gemcitabina inibiu significativamente o crescimento tumoral. [43]

Porém, Kangasniemi *et al*³⁹ que estudaram os efeitos isolados e em associação com a gemcitabina de vários mosaicos também derivados de AV tipo 5 e tipo 3 e cujas cápsides tinham sido implantadas com partículas de sílica, verificaram que o AV, apesar de apresentar alguma eficácia antitumoral, não garantia acréscimo de eficácia quando em associação com a gemcitabina. Ainda assim, nas linhagens de ACP investigadas (HS766T, SW1990, Capan2, HPAC e PANC1), a presença de sílica induziu uma menor produção de anticorpos antivirais e uma menor carga viral ao nível do fígado, aumentando a distribuição pancreática, o que suscita o interesse por estudos que determinem janelas terapêuticas (intervalo entre a dose mínima e a dose máxima eficazes). [39]

2. HERPES SIMPLEX VIRUS

O *Herpes simplex virus* (HSV) foi o primeiro VO a ser aprovado para o tratamento de lesões cutâneas irrecorríveis de melanoma nos Estados Unidos da América, Europa e Austrália (2015-2016), como já referido anteriormente, e já se estabeleceu como opção terapêutica importante no controlo de cancro como o da pele, do cólon e do sistema nervoso central [44]. Por diversas razões, o HSV parecia também ser um agente promissor no tratamento do ACP: 1) são capazes de infetar as células sem integrarem o seu material genético no genoma da célula-hospedeira, o que elimina o risco de mutações de inserção; [44] 2) a eliminação total de células pode ser conseguida de forma rápida com uma baixa multiplicidade de infeção (rácio

entre o número de agentes, neste caso virais, para o número de células-alvo); 3) vários ensaios clínicos já demonstraram a sua segurança; e 4) existe uma grande panóplia de agentes anti-HSV específicos como o aciclovir [45] e o ganciclovir que permitem circunscrever a infecção indesejada. [46] No entanto, os primeiros HSV mutantes revelaram-se pouco eficazes na terapêutica do ACP. [45]

Gayral *et al*⁴⁵ estudaram o HSVmyb34.5, um mutante derivado do HSV estirpe F *wild-type*, capaz de replicação seletiva em células portadoras do promotor B-myb, em três linhagens pancreáticas tumorais (BxPC3, MiaPaCa2 e Capan2). A escolha do promotor deve-se ao fato deste se encontrar sobreexpresso no ACP, algo que, de acordo com os autores, ainda não tinha sido relatado na literatura e que foi verificado durante o estudo. Tanto o HSV *wild-type* como o HSV mutado foram capazes de replicação nas células pancreáticas tumorais, tendo havido uma diminuição da viabilidade celular. A administração intratumoral de HSVmyb34.5 em ratinhos resultou numa inibição profunda da progressão tumoral, tendo havido sinais de necrose tumoral massiva, hemorragia e infiltrado inflamatório. O fato de os animais serem imunodeprimidos sugeriu que a atividade antitumoral se devesse ao vírus e não à resposta imune do hospedeiro. Foi ainda testada a terapia combinada HSVmyb34.5+gemcitabina que demonstrou atividade antiproliferativa *in vitro* e um crescimento tumoral menor quando comparado com a gemcitabina isolada *in vivo*. [45]

Contudo, no estudo de Kulu *et al*⁴⁷ após a administração de combinações HSV+fármaco antineoplásico (metotrexato, 5-fluorouracil, irinotecano ou TNF- α) numa linhagem pancreática (Capan2) e em quatro não pancreáticas, todas tumorais, verificou-se que a administração simultânea de HSV e agentes de quimioterapia resultava numa inibição da atividade replicativa viral e de oncólise. [47] Apesar de não ser possível estabelecer uma correlação direta entre os resultados dos dois estudos por não terem sido usados os mesmos

fármacos, os resultados de Kulu *et al*⁴⁷ sugerem que a resposta celular à quimioterapia poderá ser desfavorável à replicação do HSV.

De forma a fornecer ao HSV a capacidade de estimular o sistema imunitário contra as células tumorais, Liu *et al*⁴⁶ recorreram ao HSV^{GM-CSF}. Trata-se de um mutante atenuado mas ainda competente em termos de replicação, no qual foi introduzido um gene que codifica o GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor – fator estimulador de colónias de granulócitos e macrófagos) [46] capaz de impulsionar a resposta imune antitumoral através do recrutamento de células apresentadoras de antigénio [16] e indução da proliferação e diferenciação de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e monócitos. Na linhagem celular de ACP PANC2 verificou-se uma menor velocidade de proliferação e uma maior expressão de GM-CSF em relação ao grupo controlo, e também que a redução do tamanho do tumor era dependente da dose viral.

3. PARVOVIRUS

O *Parvovirus* H-1PV é um VO não patogénico em humanos, sendo que não existem registos de imunidade anti-H-1PV na população mundial. O que se sabe é que estes vírus são capazes de matar eficazmente células de ACP, mesmo as que são resistentes à gemcitabina, e que são capazes de envolver o sistema imunitário na resposta antitumoral. [48]

Ainda que não represente risco aparente para os seres humanos, Hajda *et al*⁴⁹ visaram estudar a segurança e tolerância do H-1PV em indivíduos com ACP. O estudo foi realizado numa amostra de 7 doentes que apresentavam progressão da doença apesar de tratamento adequado, pelo menos uma metástase hepática, funções orgânicas razoavelmente mantidas e, no caso das mulheres, teste de gravidez negativo. A estes doentes foram administradas doses crescentes de H-1PV de acordo com a **Fig. 11** e verificou-se que o vírus era seguro e bem tolerado após administração endovenosa e intratumoral, sem que houvesse efeitos secundários de maior.

Também não foram registados sinais de lesões tecidulares locais nem de toxicidade orgânica *major*. O passo seguinte passará por avaliar a farmacocinética e as capacidades antitumorais deste vírus. [49]

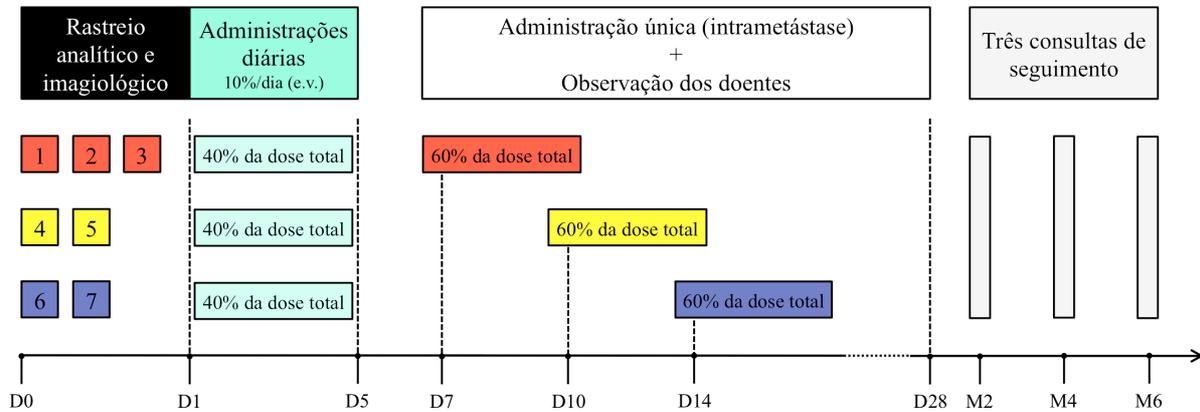


Figura 11 – Protocolo de administração de H-1PV e seguimento dos doentes. Adaptado de [49]. Durante quatro dias, foram administradas diariamente 10% da dose total; os restantes 60% foram administrados em dose única no dia 7 (indivíduos 1,2 e 3), no dia 10 (indivíduos 4 e 5) e no dia 14 (indivíduos 6 e 7). Até ao 28º dia, os doentes foram mantidos sob observação, tendo sido reavaliados ao 2º, 4º e 6º mês após o início do estudo. 1-7 – indivíduos doentes | **D** – dia | **M** – mês

Este ensaio clínico ainda está por concluir pelo que não foi possível tirar ilações sobre possíveis diferenças secundárias aos diferentes tempos de administração da segunda dose nem sobre eventuais efeitos a médio prazo.

O H-1PV é também capaz de induzir a acumulação de espécies reativas de oxigénio, que são responsáveis por danos no DNA e apoptose. Com o intuito de explorar esta particularidade, Li *et al*⁵⁰ estudaram os efeitos da administração concomitante de H-1PV e ácido valpróico (antiepilético) em três linhagens de ACP (ASPC1, MiaPaCa e T3M4) e quatro linhagens tumorais não pancreáticas, tendo-se verificado um efeito sinérgico superior ao da administração isolada de H-1PV. *In vivo*, esta combinação levou à erradicação completa das células tumorais, sem que tivesse havido efeitos nocivos para os animais. [50]

Num outro estudo pré-clínico, a infeção de quatro linhagens pancreáticas tumorais (ASPC1, MiaPaCa, PANC1 e T3M4) com H-1PV levou à secreção de HMGB1, uma proteína capaz de induzir resposta imune em todas as células, independentemente de estarem ou não em

processo ativo de morte celular. Isto sugere que a libertação desta proteína poderá tratar-se de uma reação à infecção em si e não à morte celular que advém da oncólise. Nas mesmas linhagens, foram também investigados os efeitos que adviriam da associação do vírus com a gemcitabina e verificou-se que, para além da libertação de HMGB1, existia sinergismo antitumoral da associação quando comparada com a administração isolada de H-1PV. [51]

4. REOVIRUS

O *Reovirus* (RV) é um VO benigno e não está associado a nenhuma doença humana conhecida, apesar de ser altamente prevalente na população humana. Mesmo sem manipulação genética, o RV demonstra capacidade de replicação preferencial em células que apresentem ativação do gene *KRAS* como é o caso do ACP. Como já referido anteriormente, esta mutação está presente na grande maioria dos ACP, o que torna este vírus apelativo como possibilidade terapêutica. [52]

Carew et al⁵³ comprovaram na sua investigação a natureza seletiva do *Reolysin*, um RV *wild-type* tipo 3 cuja utilização já avançou entretanto para ensaios clínicos. Os mecanismos de ação de indução de morte celular ainda são desconhecidos mas verificou-se que *in vitro*, o *Reolysin* diminui a viabilidade celular e induziu morte celular por apoptose, e quando em associação com o bortezomib, um agente antineoplásico, verificava-se potenciação da sua ação antitumoral. Esta combinação *in vivo* levou a uma diminuição do tamanho tumoral mais marcada comparativamente à administração isolada do vírus ou do agente antineoplásico, não tendo havido sinais de intolerância à terapêutica ou toxicidade. [53]

Contrariamente ao que seria de esperar com base nestes resultados, o ensaio clínico de Noonan et al⁵⁴, posterior ao de Carew et al⁵³, revelou-se pouco inspirador. O objetivo era avaliar a eficácia do *Reolysin* em associação com dois agentes antineoplásicos (carboplatina e paclitaxel), em doentes com ACP metastizado. A amostra de 73 doentes foi dividida em dois

grupos e ao primeiro (36 doentes) foi administrado carboplatina/paclitaxel+*Reolysin*; ao segundo (37 doentes) foi administrado apenas carboplatina/paclitaxel. Terminado o estudo, verificou-se que não houve diferenças entre os dois grupos em termos de tempo livre de progressão de doença nem de tempo de sobrevivência global (**Tabela 7**). Ainda assim, a administração de *Reolysin* revelou-se segura e bem tolerada. [54]

Tabela 7 – Resumo dos resultados do ensaio clínico de Noonan *et al.*

Adaptado de [54].

	Total (n = 73)	Grupo 1 (n = 36)	Grupo 2 (n = 37)
Tempo de progressão livre de doença (média em meses)	5,16	4,94	5,30
Sobrevivência global (média em meses)	7,85	7,31	8,77
Número de doentes com níveis de CA 19-9 de base normais	11	6	5
Número de doentes que apresentaram diminuição dos níveis de CA 19-9 de base $\geq 75\%$	16	5	11

CA 19-9 – *carbohydrate antigen 19-9*, antígeno carbohidrato 19-9

5. VÍRUS DA DOENÇA DE NEWCASTLE

O vírus da doença de Newcastle (VDN) é um vírus normalmente não patogénico na espécie humana mas que se provou capaz de lisar células tumorais provenientes de mamíferos. Os seus hospedeiros naturais são as aves e é de acordo com a sua patogenicidade neste animais que se pode proceder à sua divisão em três grandes grupos (**Tabela 8**). A virulência destes vírus correlaciona-se com as suas propriedades oncolíticas, sendo que mais virulento é o VDN, maior é a sua capacidade de replicação em células tumorais. [55]

Tabela 8 – Classificação dos vírus da doença de Newcastle.

Adaptado de [55].

Tipo	Virulência em aves	Efeito oncolítico
Lentogénico	Não virulento	Não oncolítico
Mesogénico	Virulência intermédia	Oncolítico
Velogénico	Virulência elevada	Oncolítico

O VDN tem a grande vantagem de quase 100% da população mundial ser seronegativa para este vírus, o que à partida evita uma *clearance* viral tão exuberante como quando há imunidade pré-existente. Em contrapartida, já foram relatados casos de infecções naturais com estirpes velogénicas que levaram ao desenvolvimento de sintomas ligeiros a moderados (síndrome gripal, faringite e conjuntivite), o que foi confirmado em ensaios clínicos que visavam testar a segurança da sua administração. [55]

Tanto as estirpes mesogénicas como velogénicas são capazes de induzir oncólise, mas por temerem a possibilidade de uma epidemia não intencional, Walter et al optaram por avaliar a citotoxicidade direta do VDN lentogénico *LeSota* (VDN-LS) em sete linhagens tumorais pancreáticas (BxPC3, Capan-1, CFPAC-1, PANC1, PANC10.05, PL45 e SU.86.86) e em quatro linhagens de células humanas (células endoteliais vasculares, células pancreáticas ductais, fibroblastos e queratinócitos). O que se verificou foi todas as linhagens eram susceptíveis a citotoxicidade, ocorrendo o pico de mortalidade celular quatro dias após a exposição ao vírus. No mesmo estudo, as células tumorais revelaram ser até 700 vezes mais sensíveis ao VDN-LS que as células normais, o que implicava que baixas doses seriam eficazes em células tumorais pancreáticas sem compromisso da viabilidade das células saudáveis. [56]

Posteriormente, a mesma equipa conduziu um estudo semelhante com duas estirpes lentogénicas diferentes: o VDN *Hitchner-B1* (VDN-B1) e o VDN *Ulster* (VDN-U). Verificou-se que o VDN-B1, tal como o VDN-LS, induzia citotoxicidade em todas as linhagens celulares, sendo as células tumorais aproximadamente 1500 vezes mais sensíveis a este vírus do que as células saudáveis. O VDN-U, no entanto, causou citotoxicidade generalizada com doses baixas. Apenas duas linhagens tumorais demonstraram uma sensibilidade superior às células normais, requerendo doses virais muito baixas. [57]

Com bases nestes resultados e dada a sua baixa virulência, o VDN-LS e o VDN-B1 são passíveis de ser considerados possíveis candidatos a ensaios clínicos. Contudo, são ainda necessários estudos *in vivo* que explorem a farmacocinética e farmacodinâmica destes agentes.

6. VÍRUS DO SARAMPO

O vírus do sarampo (VS) é um vírus altamente contagioso, podendo causar infecção em até 90% da população não imunizada após exposição viral. As campanhas de vacinação contribuíram grandemente para uma diminuição drástica na prevalência e mortalidade da doença. As estirpes atenuadas utilizadas em ensaios clínicos são derivadas da estirpe *wild-type* isolada por John Enders, que conseguiu atenuar a sua virulência, dando origem às linhagens usadas em vacinas. [58]

Como referido anteriormente na presente secção, os principais recetores do VS são o MSAL e o CD46, uma proteína membranar. No entanto, a nectina-4 foi identificada recentemente como um terceiro recetor, tanto para as estirpes *wild-type* como para as modificadas. [58]

A nectina-4 pertence a uma família de proteínas de adesão celular imunoglobulina-like, importantes para a formação e manutenção das junções aderentes e das junções oclusivas (*tight junctions*). Em tecidos saudáveis, é específica do embrião e da placenta, mas já se verificou a sua expressão em tecidos tumorais, nomeadamente da mama, ovário e pulmão. [59] No ACP também se verificou uma expressão aumentada desta proteína, tendo-se especulado que pudesse ser um interveniente na proliferação tumoral e na angiogénese. No entanto, pouco se sabe acerca do seu papel no ACP. [60]

Awano *et al* criaram um VS recombinante que infetava seletivamente células que expressavam nectina-4 mas que “ignoravam” o recetor MSAL. O objetivo passou por evitar uma imunossupressão marcada, uma vez que o MSAL está presente em células imunitárias, e

explorar as potencialidades de um VS específico para nectina-4. Das dezasseis linhagens tumorais pancreáticas estudadas (ASPC1, Capan-2, HS766T, KLM1, KP-1N, MiaPaCa2, PANC1, PK1, PK9, PK45H, PK45P, PK59, PNS-1, SNU-324, SNU-410 e SUIT-2), apenas quatro expressaram nectina-4. No entanto, dessas quatro linhagens, todas se revelaram susceptíveis ao VS, tendo sido infetadas e eliminadas de forma eficaz. [60]

7. VACCINIA VIRUS

O *Vaccinia virus* (VV) é um VO que teve um papel importante na história da erradicação da varíola e que desde então tem sido usado nas suas formas atenuadas em diversas vacinas. Entretanto, o VV tornou-se também num agente interessante para a viroterapia por diversos motivos: 1) não possui recetores de superfície específicos, o que lhe permite infetar uma grande variedade de células; 2) a sua transcrição não está dependente da maquinaria da célula-hospedeira; [61] 3) a sua replicação é citoplasmática, o que contorna a possibilidade de integração do genoma viral no genoma da célula-hospedeira, e rápida, podendo ser detetada 4 a 6 horas após a infeção; e 4) o fenómeno de amplificação pode começar tão cedo como duas horas pós-oncólise. Tanto ensaios pré-clínicos como clínicos demonstraram que o VV pode ser administrado de forma endovenosa ou intratumoral de forma eficaz [62] e que curiosamente as condições de hipoxia não afetavam a replicação nem a citotoxicidade (*in vitro*) da estirpe *Lister*. [61]

No ensaio clínico de Zeh et al, verificou-se que administração de VV era bem tolerada, não tendo surgido sinais de toxicidade que impedissem o aumento gradual da dose. Ainda assim, 93% dos indivíduos apresentaram sintomas consistentes com replicação viral ativa (febre, mal-estar e/ou dor) 5 a 15 dias após a infeção. [63]

Para investigar os efeitos citotóxicos da administração combinada de um VV estirpe *Lister* e dois agentes antineoplásicos (gemcitabina e nab-paclitaxel) sobre o ACP, Binz et al

conduziram um ensaio pré-clínico em quatro linhagens pancreáticas derivadas de ACP (ASPC1, BxPC3, MiaPaCa2 e PANC1) (**Tabela 9**). [64]

Tabela 9 – Resumo dos resultados do ensaio clínico de Binz *et al.*

Adaptado de [64].

Regime terapêutico	Citotoxicidade
VV / G / N (monoterapia)	Sem diferenças de citotoxicidade significativas entre si.
VV+G	Sem diferenças de citotoxicidade comparativamente aos mesmos agentes em monoterapia.
VV+N	Citotoxicidade ligeiramente superior comparativamente aos mesmos agentes em monoterapia.
VV+G+N	Citotoxicidade superior comparativamente aos mesmos agentes em monoterapia (50% das linhagens).

G – gemcitabina | N – nab-paclitaxel | VV – *Vaccinia virus*.

Nas duas linhagens em que não se registaram diferenças entre a administração tripla e os agentes em monoterapia, verificou-se uma diminuição da replicação viral, possivelmente secundária à presença dos agentes antineoplásicos. [64]

8. SÍNTESE

A **Tabela 10** exprime os resultados dos diversos ensaios pré-clínicos e clínicos abordados nesta secção.

Tabela 10 – Viroterapia no adenocarcinoma pancreático

Vírus	Características
AV	<p>Seguro Bem tolerado Estável; com menor tropismo hepático e indução da produção de anticorpos (após modificação da cápside) Citotoxicidade Replicação seletiva Sinergismo AV+AV AV+gemcitabina \geq gemcitabina isolada</p>
HSV	<p>Seguro Bem tolerado Citotoxicidade Replicação seletiva HSV+gemcitabina > gemcitabina isolada HSV+fármaco antineoplásico (metotrexato, 5-fluorouracil, irinotecano ou TNF-α) \rightarrow inibição da atividade replicativa e de oncólise</p>
PV	<p>Seguro Bem tolerado Citotoxicidade PV+ácido valpróico > PV isolado PV+gemcitabina > PV isolado</p>
RV	<p>Seguro Bem tolerado Citotoxicidade RV+bortezomib > RV ou bortezomib RV+carboplatina/paclitaxel = carboplatina/paclitaxel</p>
VDN	<p>Relativamente seguro Citotoxicidade</p>
VS	<p>Altamente contagioso Citotoxicidade em células nectina-4 positivas</p>
VV	<p>Bem tolerado Citotoxicidade VV+gemcitabina = VV ou gemcitabina VV+paclitaxel \geq VV ou paclitaxel VV+gemcitabina+paclitaxel \geq VV ou gemcitabina ou paclitaxel</p>

AV – Adenovirus | **HSV** – Herpes simplex virus | **PV** – Parvovirus | **RV** – Reovirus | **VDN** – vírus da doença de Newcastle | **VS** – vírus do sarampo | **VV** – Vaccinia vírus.

VI – DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Apesar da sua baixa incidência, o adenocarcinoma pancreático permanece um dos grandes desafios da Medicina, uma vez que o seu diagnóstico, quase sempre tardio e geralmente numa fase de grande resistência à terapêutica, confere mau prognóstico.

A recorrência à viroterapia teve como objetivo procurar uma alternativa terapêutica que permitisse melhorar o prognóstico ou mesmo encontrar uma cura. Desde a sua “redescoberta” há cerca de 30 anos, múltiplos ensaios pré-clínicos e clínicos foram conduzidos nesse sentido, e a maioria com resultados insatisfatórios.

Mais recentemente, vários investigadores realizaram estudos que permitem pressupor que o *Adenovirus*, o *Herpes simplex virus*, o *Parvovirus*, o *Reovirus*, o vírus do sarampo e o *Vaccinia virus*, podem vir a ser utilizados como agentes terapêuticos no adenocarcinoma pancreático.

Genericamente, todos os vírus abordados neste trabalho de revisão demonstraram capacidade oncolítica e eficácia antitumoral, muitas vezes potenciadas pela coadministração de fármacos antineoplásicos, sendo seguros e bem tolerados após administração endovenosa e/ou intratumoral.

Estes resultados não deixam de ser promissores, mas a maior parte dos estudos ainda se encontra na fase pré-clínica e os que já avançaram para a fase clínica apenas testaram a segurança e a tolerabilidade, pelo que não é ainda possível saber até que ponto serão os vírus efetivamente eficazes contra o adenocarcinoma pancreático. Por outro lado, a falta de estudos comparativos entre diferentes famílias virais impossibilita a estratificação dos níveis de segurança e eficácia que apresentam.

Ainda assim, de todos os vírus abordados, o *Herpes simplex virus* poderá ser o que menos sucesso alcançará na luta contra o adenocarcinoma pancreático, já que foi o único a apresentar

inibição da atividade replicativa e oncólise, isto quando em associação com agentes antineoplásicos.

Vírus como o *Adenovirus*, *Reovirus* e vírus do sarampo, que são altamente prevalentes na população, e o *Vaccinia virus*, usado em vacinas, têm como desvantagem que a grande maioria das pessoas seja seropositiva contra eles. No caso do *Adenovirus*, a modificação da cápside provou-se eficaz na diminuição da produção de anti anticorpos, o que possibilitou um aumento da biodisponibilidade. Este precedente permite colocar a hipótese de que o mesmo possa acontecer com os demais vírus. É, no entanto, necessário que se realizem estudos no sentido de a comprovar ou negar.

São também necessários mais estudos no sentido de explicar como funcionam os mecanismos concretos de indução de citotoxicidade e resposta imunitária antitumorais e como se processa a farmacocinética e a farmacodinâmica destes agentes virais.

Perante este panorama, pode-se concluir que, apesar dos vários anos de investigação, a viroterapia como opção terapêutica no adenocarcinoma pancreático tem ainda um longo caminho a percorrer.

ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

A – Adenina

ACP – Adenocarcinoma pancreático

AV – *Adenovirus*

CD4+/CD8+ – Linfócitos T

CDK – Cinasas dependentes de ciclina (*cyclin-dependent kinase*)

DAMP – Sinais de padrões moleculares associados a danos (*damage-associated molecular pattern signals*)

DNA – Ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)

EGF – Fator de crescimento epidérmico (*epidermal growth factor*)

FC – Fatores de crescimento

FGF – Fator de crescimento de fibroblastos (*fibroblast growth factor*)

FI – Fatores invasivos

FOLFIRINOX – Regime de quimioterapia com ácido folínico, 5-fluorouracil, irinotecano e oxaliplatina

FPA – Fatores pró-angiogénicos

G – Guanina

GDP – Guanosina difosfato (*guanosine diphosphate*)

GTP – Guanosina trifosfato (*guanosine triphosphate*)

HSV – *Herpes simplex virus*

IPMN – Neoplasias papilares intraductais mucinosas (*intraductal papillary mucinous neoplasms*)

MCN – Neoplasias císticas mucinosas (*mucinous cystic neoplasms*)

miRNA – Micro ácido ribonucleico (*micro ribonucleic acid*)

NGF – Fator de crescimento nervoso (*nerve growth factor*)

NK – Linfócitos *natural killer*

PAMP – Sinais de padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular pattern signals*)

PanIN – Neoplasia intraepitelial pancreática (*pancreatic intraepithelial neoplasia*)

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas (*platelet derived growth factor*)

PV – *Parvovirus*

Rb – Retinoblastoma

RNA – Ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)

RV – *Reovirus*

T – Timina

TGF- β – Fator de transformação do crescimento beta (*transforming growth factor beta*)

TLR – Receptores *toll-like* (*toll-like receptors*)

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa (*tumor necrosis factor alpha*)

TNM – Tumor, Nódulo, Metástase

TRAIL – Ligando indutor de apoptose relacionado com o TNF (*TNF-related Apoptosis Inducing Ligand*)

VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular (*vascular endothelial growth factor*)

VO – Vírus oncolítico(s)

VS – Vírus do Sarampo

VV – *Vaccinia virus*

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação TNM	05
Tabela 2 – Estadiamento do Adenocarcinoma Pancreático	05
Tabela 3 – miRNAs mais frequentemente desregulados no adenocarcinoma pancreático	17
Tabela 4 – Fatores sobreexpressos pelas Células Pancreáticas Estreladas	19
Tabela 5 – Vírus oncolíticos	23
Tabela 6 – Ensaio clínico	32
Tabela 7 – Resumo dos resultados do ensaio clínico de Noonan <i>et al</i>	41
Tabela 8 – Classificação dos vírus da doença de Newcastle	41
Tabela 9 – Resumo dos resultados do ensaio clínico de Binz <i>et al</i> .	45
Tabela 10 – Viroterapia no adenocarcinoma pancreático	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Gestão terapêutica do adenocarcinoma pancreático	07
Figura 2 – Lesões precursoras do adenocarcinoma pancreático	11
Figura 3 – Oncogénese do adenocarcinoma pancreático	12
Figura 4 – Ciclos fusão-ponte-quebra	15
Figura 5 – Principais vias de sinalização desreguladas no adenocarcinoma pancreático	16
Figura 6 – Papel das células pancreáticas estreladas no microambiente tumoral do adenocarcinoma pancreático	18
Figura 7 – Marcos históricos da viroterapia	22
Figura 8 – Fatores que predisõem a célula tumoral à infeção viral	24
Figura 9 – Mecanismos antitumorais dos vírus oncolíticos	25
Figura 10 – Aspetos a ter em conta durante a projeção e execução de ensaios clínicos	31
Figura 11 – Protocolo de administração de H-1PV e seguimento dos doentes	39

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Doutor Rui Vasco Quintais Gradiz e à Professora Doutora Anabela Mota Pinto pelo apoio e pela ajuda inestimáveis durante todo o processo de elaboração deste Trabalho Final.

Agradeço também aos amigos que me acompanharam ao longo do percurso e que certamente continuarão a fazê-lo futuramente. Deixo palavras de especial apreço ao João Pimentel, à Sofia Paiva, ao Henrique Gouveia e às Mondeguinas – Tuna Feminina da Universidade de Coimbra.

Por último, agradeço às pessoas mais importantes da minha vida: ao meu irmão Harrison e aos meus pais Rosa Afonso e Martinho Stock. Não existem palavras que cheguem, mas fica o “Obrigada por tudo!”.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rahal A, Musher B. Oncolytic viral therapy for pancreatic cancer. *J Surg Oncol*. 2017 Jul; 116(1):94-103.
2. Rouanet M, Lebrin M, Gross F, Bournet B, Cordelier P, Buscail L. Gene Therapy for Pancreatic Cancer: Specificity, Issues and Hopes. *Int. J. Mol. Sci*. 2017 Jun; 18(6):1231.
3. Stolzenberg-Solomon R Z, Amundadottir L T. Epidemiology and inherited predisposition for sporadic pancreatic adenocarcinoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2015 Aug; 29(4):619-40.
4. Yeo T P, Lowenfels A B. Demographics and Epidemiology of Pancreatic Cancer. *Cancer J*. 2012 Nov-Dec; 18(6):477-84.
5. Hartwig W, Büchler M W. Pancreatic Cancer: Current Options for Diagnosis, Staging and Therapeutic Management. *Gastrointest Tumors*. 2013 Sep; 1(1):41–52.
6. Gharibi A, Adamian Y, Kelber J A. Cellular and molecular aspects of pancreatic cancer. *Acta Histochem*. 2016 Apr; 118(3):305-16.
7. Feig C, Gopinathan A, Neesse A, Chan D S, Cook N, Tuveson D A. The pancreas cancer microenvironment. *Clin Cancer Res*. 2012 Aug 15; 18(16):4266–4276.
8. Tempero M A, Malafa M P, Al-Hawary M, Asbun H, Bain A, Behrman S W, *et al*. Pancreatic Adenocarcinoma Version2.2017: Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2017 Aug; 15(8):1028-1061.
9. Ibrahim A M, Wang Y H. Viro-immune therapy: A new strategy for treatment of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2016 Jan 14; 22(2):748-763.

10. Cicenas J, Kvederaviciute K, Meskinyte I, Meskinyte-Kausiliene E, Skeberdyte A, Cicenas Jr J. KRAS, TP53, CDKN2A, SMAD4, BRCA1, and BRCA2 Mutations in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*. 2017 May; 9(5):42.
11. Ady J W, Heffner J, Klein E, Fong Y. Oncolytic viral therapy for cancer: current research and future directions. *Oncolytic Virother*. 2014; 3: 35–46.
12. Fukuhara H, Ino Y, Todo T. Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn. *Cancer Sci*. 2016 Oct; 107(10):1373-1379.
13. Ungerechts G, Bossow S, Leuchs B, Holm P S, Rommelaere J, Coffey M, *et al*. Moving oncolytic viruses into the clinic: clinical-grade production, purification, and characterization of diverse oncolytic viruses. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2016; 3:16018.
14. Bilsland A E, Spiliopoulou P, Evans T R J. Virotherapy: cancer gene therapy at last? Version 1. *F1000Res*. 2016; 5:F1000 Faculty Rev-2105.
15. Choi, A H, O’Leary M P, Fong Y, Chen N G. From Benchtop to Bedside: A Review of Oncolytic Virotherapy. *Biomedicines*. 2016 Sep; 4(3):18.
16. Hamid O, Hoffner B, Gasal E, Hong J, Carvajal R D. Oncolytic immunotherapy: unlocking the potential viruses to help target cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2017 Oct; 66(10):1249-1264.
17. Distler M, Aust D, Weitz J, Pilarsky C, Grützmann R. Precursor lesions for sporadic pancreatic cancer: PanIN, IPMN, and MCN. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:474905.
18. Iacobuzio-Donahue C A. Genetic evolution of pancreatic cancer: lessons learnt from the pancreatic cancer genome sequencing project. *Gut*. 2012 Jul; 61(7):1085-94.
19. Ying H, Dey P, Yao W, Kimmelman A C, Draetta G F, Maitra A, *et al*. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev*. 2016 Feb 15; 30(4):355-85.

20. Iacobuzio-Donahue C A, Velculescu V E, Wolfgang C L, Hruban R H. The Genetic Basis of Pancreas Cancer Development and Progression: Insights From Whole-Exome and Whole-Genome Sequencing. *Clin Cancer Res.* 2012 Aug 15; 18(16):4257-65.
21. Rishi A, Goggins M, Wood L D, Hruban R H. Pathological and Molecular Evaluation of Pancreatic Neoplasms. *Semin Oncol.* 2015 Feb; 42(1):28-39.
22. MacGregor-Das A M, Iacobuzio-Donahue C A. Molecular Pathways in Pancreatic Carcinogenesis. *J Surg Oncol.* 2013 Jan; 107(1):8-14.
23. Roake C M, Artandi S E. Control of Cellular Aging, Tissue Function, and Cancer by p53 Downstream of Telomeres. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017 May 1; 7(5).
24. Hawa Z, Haque I, Ghosh A, Banerjee S, Harris L, Benerjee S K. The miRacle in Pancreatic Cancer by miRNAs: Tiny Angels or Devils in Disease Progression. *Int J Mol Sci.* 2016 May 26; 17(6).
25. Passadouro M, Faneca Henrique. Managing Pancreatic Adenocarcinoma: A Special Focus in MicroRNA Gene Therapy. *Int J Mol Sci.* 2016 May; 17(5):718.
26. Lin H J, Lin J. Seed-in-Soil: Pancreatic Cancer Influenced by Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel).* 2017 Jul 21; 9(7).
27. Perera R M, Bardeesy N. Pancreatic Cancer Metabolism - Breaking it down to build it back up. *Cancer Discov.* 2015 Dec; 5(12):1247-61.
28. Fountzilas C, Patel S, Mahalingam D. Review: Oncolytic virotherapy, updates and future directions. *Oncotarget.* 2017 May 31; 8(60):102617-102639.
29. Ilkow C S, Swift S L, Bell J C, Diallo J S. From Scourge to Cure: Tumour-Selective Viral Pathogenesis as a New Strategy against Cancer. *PLoS Pathog.* 2014 Jan; 10(1):e1003836.

30. Cassidy K A, Haworth K B, Jackson J, Markett J M, Cripe T P. To infection and Beyond: The Multi-Pronged Anti-Cancer Mechanisms of Oncolytic Viruses. *Viruses*. 2016 Feb 4; 8(2).
31. Russell S J, Peng K W, Bell J C. ONCOLYTIC VIROTHERAPY. *Nat Biotechnol*. 2012 Jul; 30(7): 658–670.
32. Howells A, Marelli G, Lemoine N R, Wang Y. Oncolytic Viruses – Interaction of Virus and Tumor Cells in the Battle to Eliminate Cancer. *Front Oncol*. 2017 Sep 8; 7:195.
33. Yokoda R, Nagalo B M, Vernon B, Oklu R, Albadawi H, DeLeon T T, *et al*. Oncolytic virus delivery: from nano-pharmacodynamics to enhanced oncolytic effect. *Oncolytic Virother*. 2017 Nov 8; 6:39-49.
34. Lawler S E, Speranza M C, Cho C F, Chiocca A. Oncolytic Viruses in Cancer Treatment: A Review. *JAMA Oncol*. 2017 Jun 1; 3(6):841-849.
35. Bell J, McFadden G. Viruses for Tumor Therapy. *Cell Host Microbe*. 2014 Mar 12; 15(3):260–265.
36. Uusi-Kerttula H, Hulin-Curtis S, Davies J, Parker A L. Oncolytic Adenovirus: Strategies and Insights for Vector Design and Immuno-Oncolytic Applications. *Viruses*. 2015 Nov 24; 7(11):6009-42.
37. Xu C, Li H, Su C, Li Z. Viral therapy for pancreatic cancer: tackle the bad guys with poison. *Cancer Lett*. 2013 Jun 1; 333(1):1-8.
38. Armstrong L, Arrington A, Han J, Gavrikova T, Brown E, Yamamoto M, *et al*. Generation of a Novel, Cox2-Targeted, Interferon-Expressing, Conditionally-Replicative Adenovirus for Pancreatic Cancer Therapy. *Am J Surg*. 2012 November; 204(5):741–750.

39. Kangasniemi L, Parviainen S, Pisto T, Koskinen M, Jokinen M, Kiviluoto T, *et al.* Effects of capsid-modified oncolytic adenoviruses and their combinations with gemcitabine or silica gel on pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 2012 Jul 1; 131(1):253-63.
40. Kleijn A, Kloezeman J, Treffers-Westerlaken E, Fulci G, Leenstra S, Dirven C, *et al.* The In Vivo Therapeutic Efficacy of the Oncolytic Adenovirus Delta24-RGD Is Mediated by Tumor-Specific Immunity. *PLoS One*. 2014 May 27;9(5):e97495.
41. Dai B, Roife D, Kang Y, Gumin J, Perez M V R, Li X, *et al.* Preclinical Evaluation of Sequential Combination of Oncolytic Adenovirus Delta-24-RGD and Phosphatidylserine-Targeting Antibody in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther*. 2017 Apr; 16(4):662-670.
42. Takei Y, Okamoto S, Kawamura K, Jiang Y, Morinaga T, Shingyoji M, *et al.* Expression of p53 synergistically augments caspases-mediated apoptosis induced by replication-competent adenoviruses in pancreatic carcinoma cells. *Cancer Gene Ther*. 2015 Sep; 22(9):445-53.
43. Kaliberov S A, Kaliberova L N, Buchsbaum D J, Curiel D T. Experimental virotherapy of chemoresistant pancreatic carcinoma using infectivity-enhanced fiber-mosaic oncolytic adenovirus. *Cancer Gene Ther*. 2014 Jul;21(7):264-74.
44. Sanchala D S, Bhatt L K, Prabhavalkar K S. Oncolytic Herpes Simplex Viral Therapy: A Stride toward Selective Targeting of Cancer Cells. *Front Pharmacol*. 2017; 8:270.
45. Gayral M, Lulka H, Hanoun N, Biollay C, Sèlves J, Vignolle-Vidoni A, *et al.* Targeted oncolytic Herpes Simplex Virus Type 1 eradicates experimental pancreatic tumours. *Hum Gene Ther*. 2015 Feb; 26(2):104-13.

46. Liu H, Yuan S J, Chen Y T, Xie Y B, Cui L, Yang W Z, *et al.* Preclinical evaluation of herpes simplex virus armed with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pancreatic carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2013 Aug 21; 19(31):5138–5143.
47. Kulu Y, Kawasaki H, Donahue J M, Kasuya H, Cusack J C, Choi E W, *et al.* Concurrent chemotherapy inhibits Herpes simplex virus 1 replication and oncolysis. *Cancer Gene Ther.* 2013 Feb; 20(2):10.
48. Angelova A L, Witzens-Harig M, Galabov A S, Rommelaere J. The Oncolytic Virotherapy Era in Cancer Management: Prospects of Applying H-1 Parvovirus to Treat Blood and Solid Cancers. *Front Oncol.* 2017; 7:93.
49. Hadja J, Lehmann M, Krebs O, Kieser M, Geletneky K, Jäger D, *et al.* A non-controlled, single arm, open label, phase II study of intravenous and intratumoral administration of ParvOryx in patients with metastatic, inoperable pancreatic cancer: ParvOryx02 protocol. *BMC Cancer.* 2017 Aug 29; 17(1):576.
50. Li J, Bonifati S, Hristov G, Marttila T, Valmary-Degano S, Stanzel S, *et al.* Synergistic combination of valproic acid and oncolytic parvovirus H-1PV as a potential therapy against cervical and pancreatic carcinomas. *EMBO Mol Med.* 2013 Oct; 5(10):1537-55.
51. Angelova A L, Grekova S P, Heller A, Kuhlmann O, Soyka E, Giese T, *et al.* Complementary Induction of Immunogenic Cell Death by Oncolytic Parvovirus H-1PV and Gemcitabine in Pancreatic Cancer. *J Virol.* 2014 May; 88(10):5263-76.
52. Zhao X, Chester C, Rajasekaran N, He Z, Kohrt H E. Strategic Combinations: The Future of Oncolytic Virotherapy with Reovirus. *Mol Cancer Ther.* 2016 May; 15(5):767-73.

53. Carew J S, Espitia C M, Zhao W, Kelly K R, Coffey M, Freeman J W, *et al.* Reolysin is a novel reovirus-based agent that induces endoplasmic reticular stress-mediated apoptosis in pancreatic cancer. *Cell Death Dis.* 2013 Jul 18; 4:e728.
54. Noonan A M, Farren M R, Geyer S M, Huang Y, Tahiri S, Ahn D, *et al.* Randomized Phase 2 Trial of the Oncolytic Virus Pelareorep (Reolysin) in Upfront Treatment of Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma. *Mol Ther.* 2016 Jun; 24(6):1150-1158.
55. Zamarin D, Palese P. Oncolytic Newcastle Disease Virus for cancer therapy: old challenges and new directions. *Future Microbiol.* 2012 Mar; 7(3):347-67.
56. Walter R J, Attar B M, Rafiq A, Tejaswi S, Delimata M. Newcastle Disease Virus LaSota Strain Kills Human Pancreatic Cancer Cells *in Vitro* with High Selectivity. *JOP.* 2012 Jan 10; 13(1):45-53.
57. Walter R J, Attar B M, Rafiq A, Delimata M, Tejaswi S. Two Avirulent, Lentogenic Strains of Newcastle Disease Virus Are Cytotoxic for Some Human Pancreatic Tumor Lines *In Vitro*. *JOP.* 2012 Sep 10; 13(5):502-13.
58. Robinson S, Galanis E. Potential and clinical translation of oncolytic measles viruses. *Expert Opin Biol Ther.* 2017 Mar; 17(3):353-363.
59. Nishiwada S, Sho M, Yasuda S, Shimada K, Yamato I, Akahori T, *et al.* Nectin-4 expression contributes to tumor proliferation, angiogenesis and patient prognosis in human pancreatic cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2015 Mar 28; 34:30.
60. Awano M, Fujiyuki T, Shoji K, Amagai Y, Murakami Y, Furukawa Y, *et al.* Measles virus selectively blind to signaling lymphocyte activity molecule has oncolytic efficacy against nectin-4-expressing pancreatic cancer. *Cancer Sci.* 2016 Nov; 107(11):1647-1652.

61. Yaghchi C A, Zhang Z, Ghassan A, Lemoine N R, Wang Y. Vaccinia virus, a promising new therapeutic agent for pancreatic cancer. *Immunotherapy*. 2015 Dec; 7(12):1249–1258.
62. Badrinath N, Heo J, Yoo S Y. Viruses as nanomedicine for cancer. *Int J Nanomedicine*. 2016 Sep 21; 11:4835-4847.
63. Zeh H J, Downs-Canner S, McCart J A, Guo Z S, Rao U N M, Ramalingam L, *et al*. First-in-man Study of Western Reserve Strain Oncolytic Vaccinia Virus: Safety, Systemic Spread, and Antitumor Activity. *Mol Ther*. 2015 Jan; 23(1):202-14.
64. Binz E, Berchtold S, Beil J, Schell M, Geisler C, Smirnow I, *et al*. Chemovirotherapy of Pancreatic Adenocarcinoma by Combining Oncolytic Vaccinia Virus GLV-1h68 with nab-Paclitaxel Plus Gemcitabine. *Mol Ther Oncolytics*. 2017 Apr 19; 6:10-21.