

Licenciatura em Ciências Biomédicas Laboratoriais

Oncobiologia

2016/17

Aula 7

Inês Rodrigues

igrodrigues@ualg.pt

Gab. 2.06 na ESSUAlg

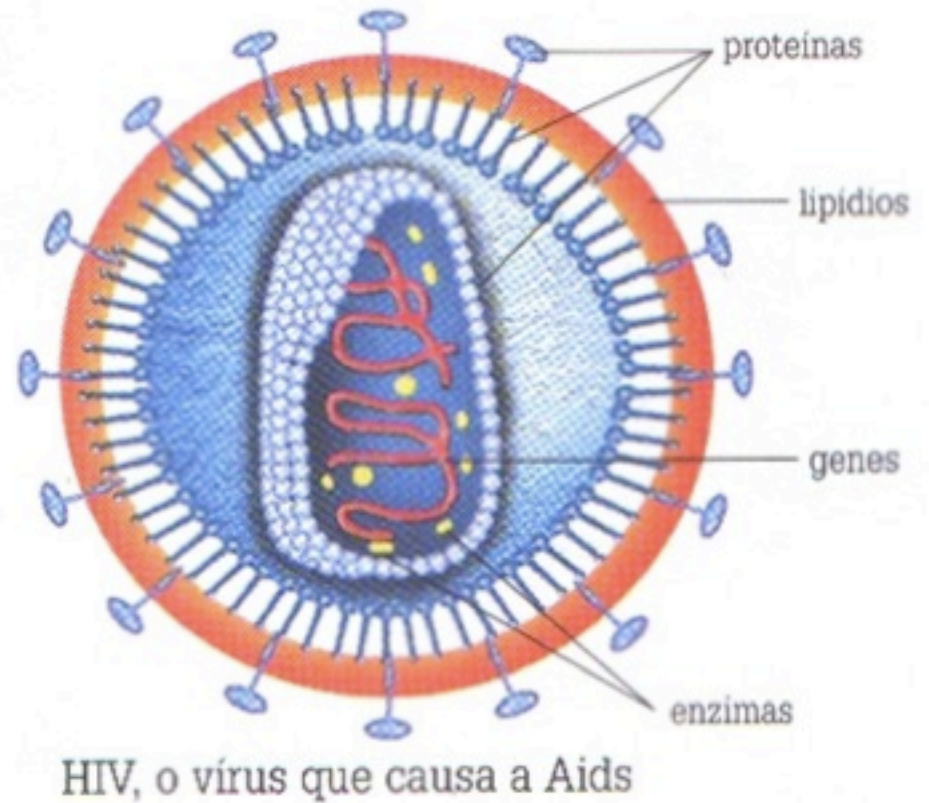
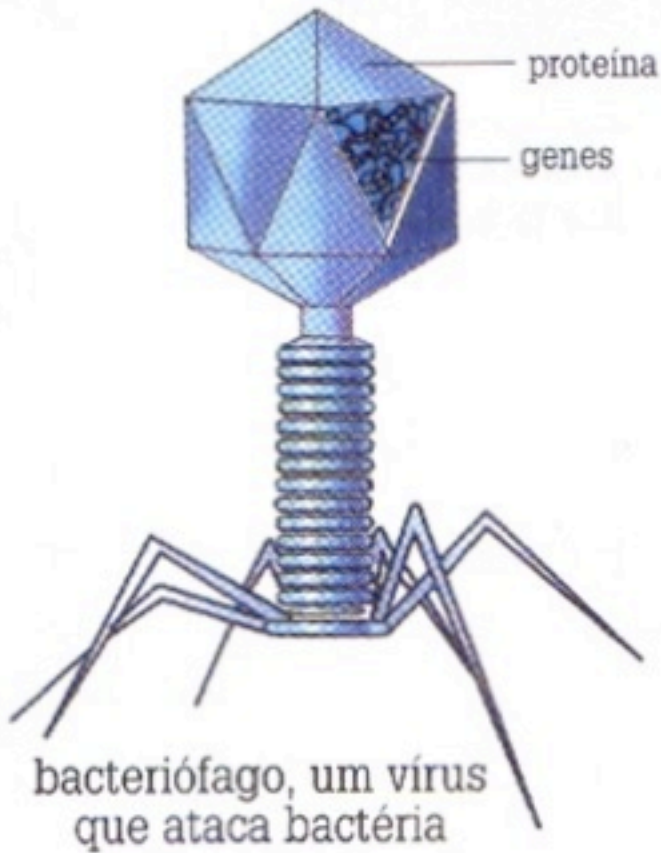
Sumário

Vírus Oncogénicos

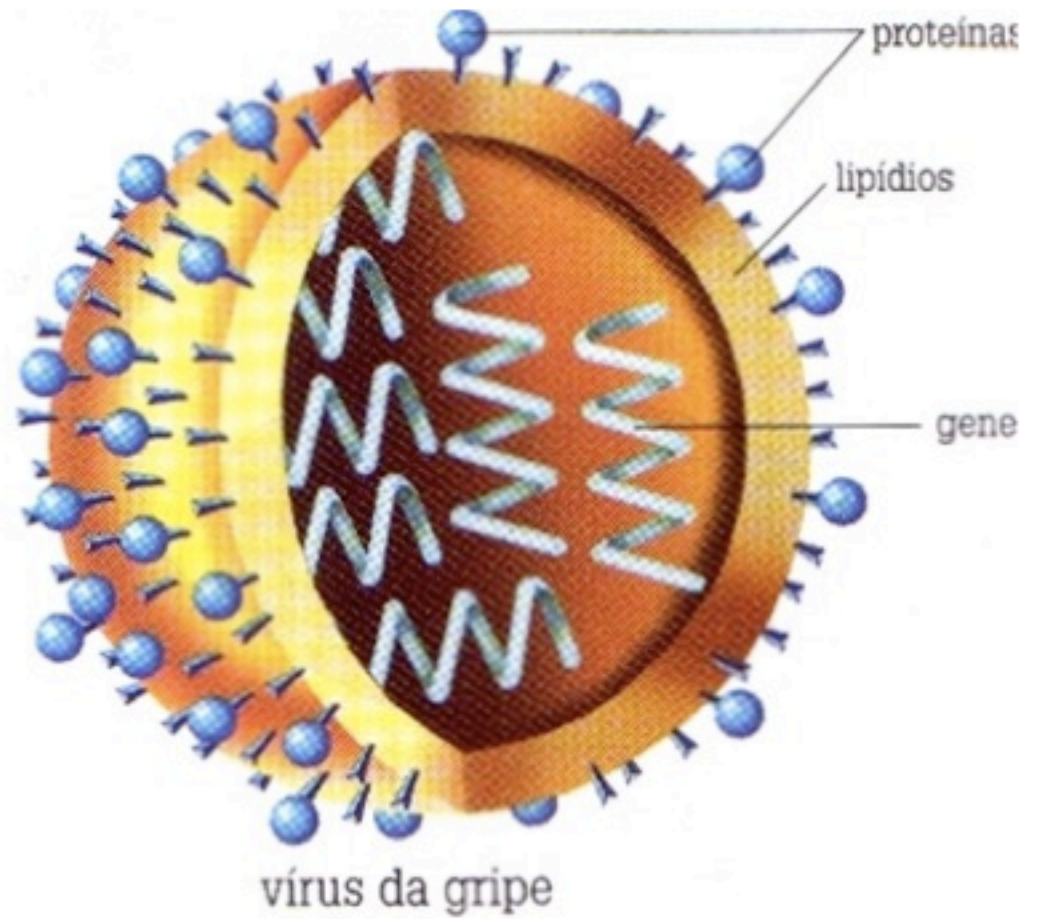
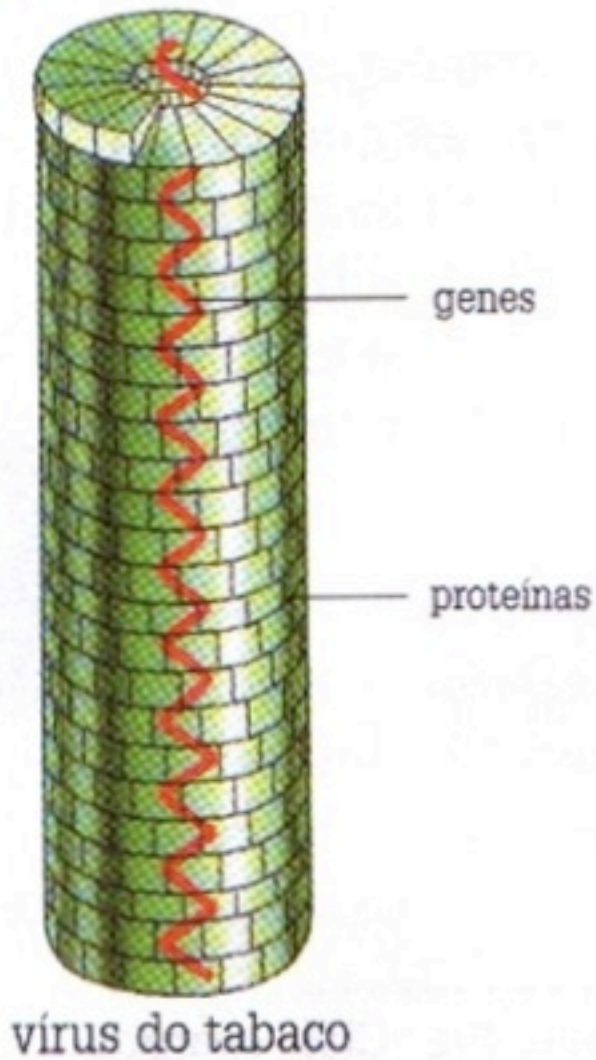
Vírus Oncolíticos

Terapia genética anticancerígena

O Que é um vírus?



O Que é um vírus?



00

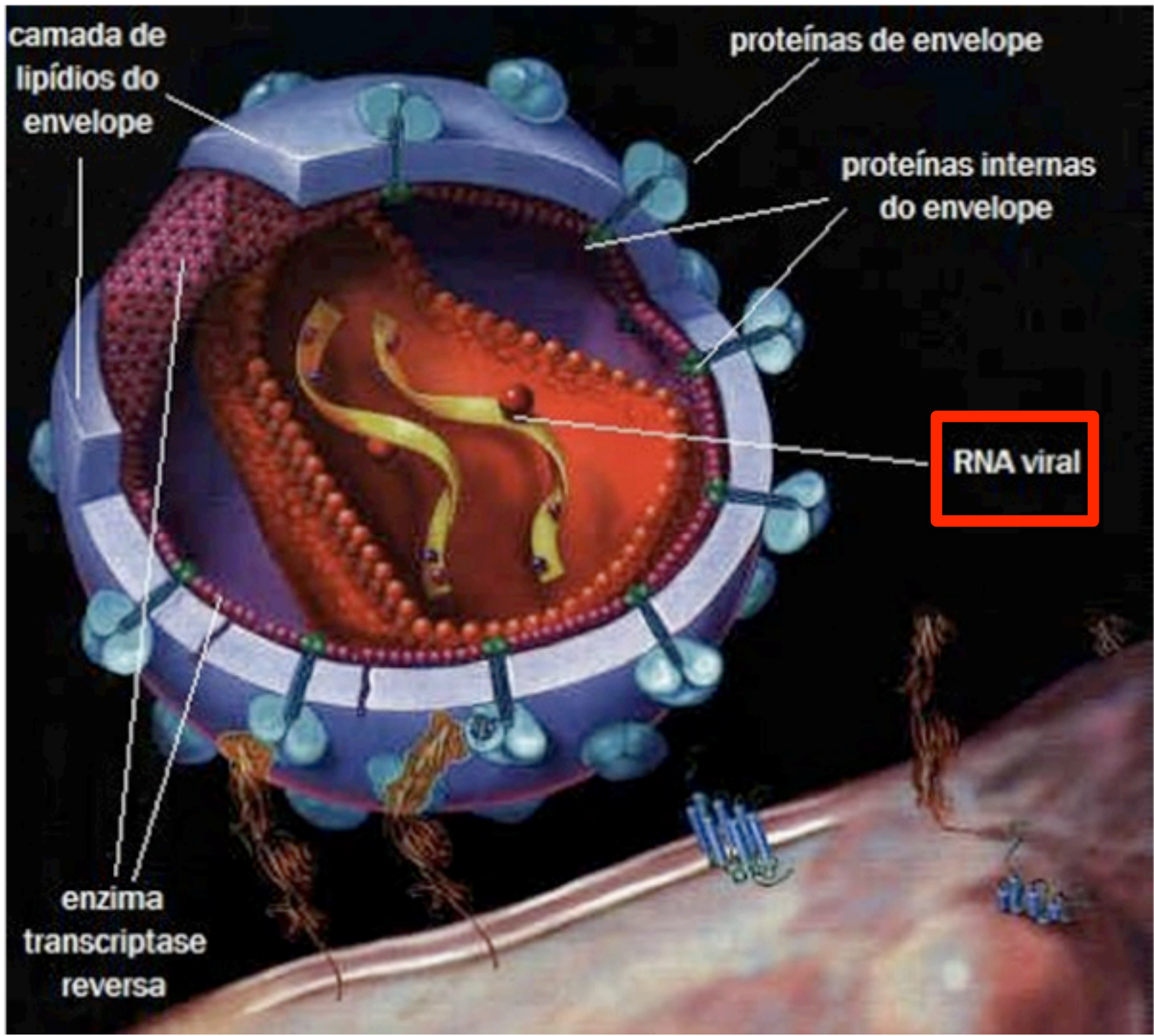
camada de lipídios do envelope

proteínas de envelope

proteínas internas do envelope

RNA viral

enzima transcriptase reversa



O Que é um vírus?

Um vírus é um organismo vivo?

Esta é uma questão controversa e ainda está por definir se os vírus são organismos vivos ou não vivos

FACTOS A FAVOR:

- Os vírus apresentam reprodução, embora necessitem de uma célula hospedeira
- Presença de material genético (DNA ou RNA) e capacidade de mutação
- Capacidade de adaptação

FACTOS CONTRA:

- Os vírus são *acelulares*
- Ausência de metabolismo próprio (necessita dos constituintes celulares do hospedeiro para se reproduzir)

O Que é um vírus?

Características principais dos vírus

- Não possuem células
- São parasitas intracelulares obrigatórios
- Não possuem metabolismo próprio
- Podem ser de DNA ou RNA
- Material genético viral possui apenas informação para produzir mRNA, rRNA e tRNA

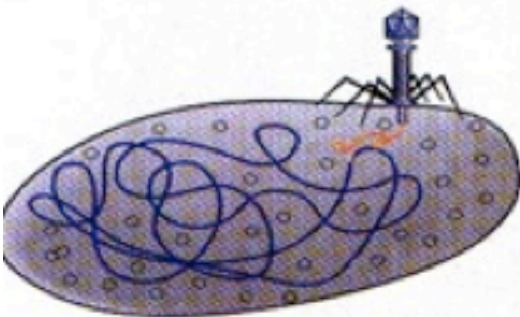
O Que é um vírus?

Reprodução Viral

- **Ciclo Lítico** – Quando ocorre a morte da célula hospedeira
- **Ciclo Lisogénico** – Quando a célula hospedeira é preservada durante a reprodução, podendo esta ocorrer através de ciclo celular a qualquer momento.

Reprodução Viral

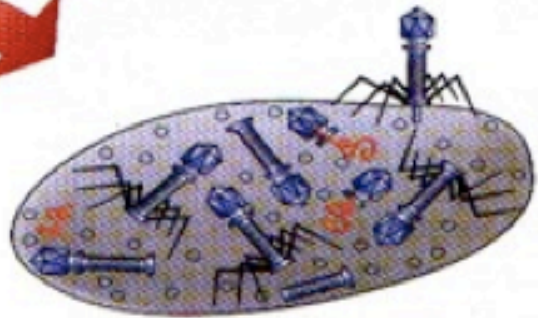
- Ciclo Lítico



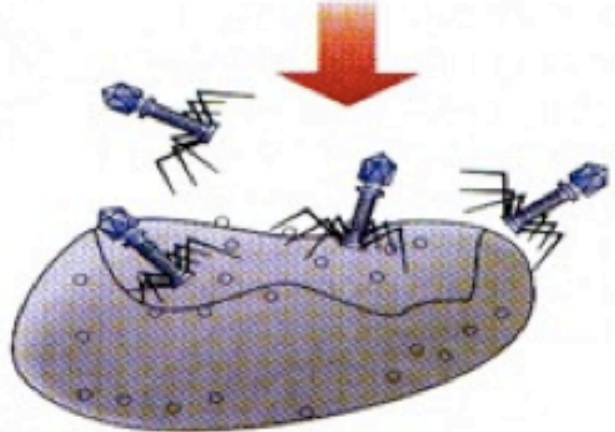
através de contrações da cauda, o vírus injeta o seu ácido nucléico na bactéria



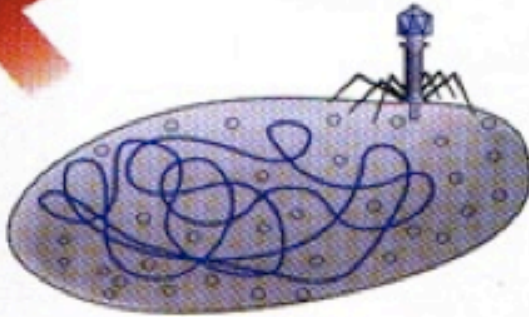
o DNA da bactéria é destruído; o DNA do vírus orienta a síntese de proteínas da cápsula e se duplica



o DNA se incorpora à cápsula, formando novos vírus



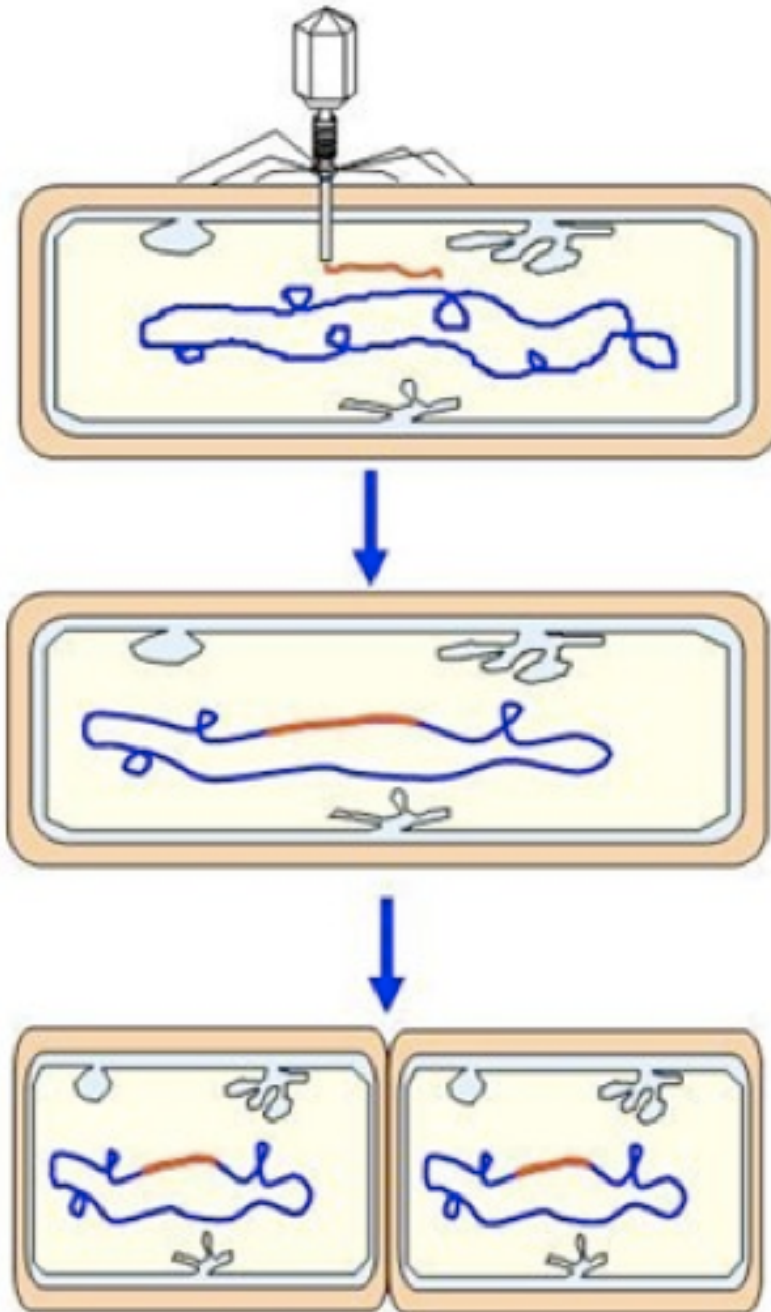
a bactéria arrebenta e os novos vírus são liberados



o vírus se fixa na bactéria; uma enzima da cauda dissolve a parede da bactéria

Reprodução Viral

- Ciclo Lisogénico



Oncogénese viral

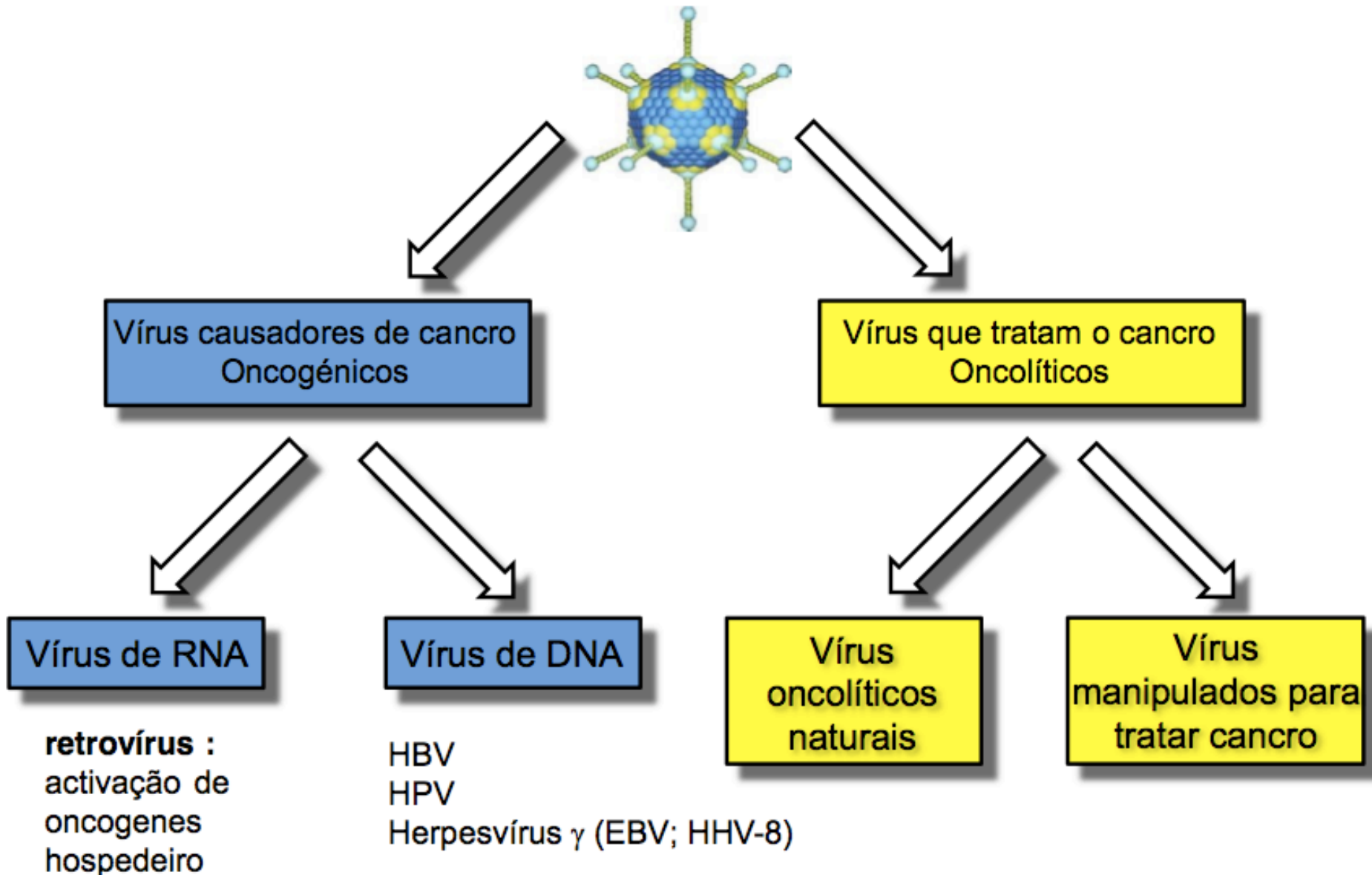
Vírus de DNA

Expressão de proteínas virais multifuncionais que regulam **oncogenes** e **genes supressores de tumor** :

- HBV (HBx; PreS2) (Virús da Hepatite B)
- HPV (E6; E7) (Papiloma Virús)
- EBV (EBNA-1; EBNA-2; LMP-1) (Herpes Virús)

→ Manipulação da célula do hospedeiro.

Vírus Oncogénicos vs Vírus Oncolíticos



Virús Oncogénicos

HTLV (RNA)

HPV (DNA)

Virús Oncolíticos

Reovirus (RNA)

Poxvirus (DNA)

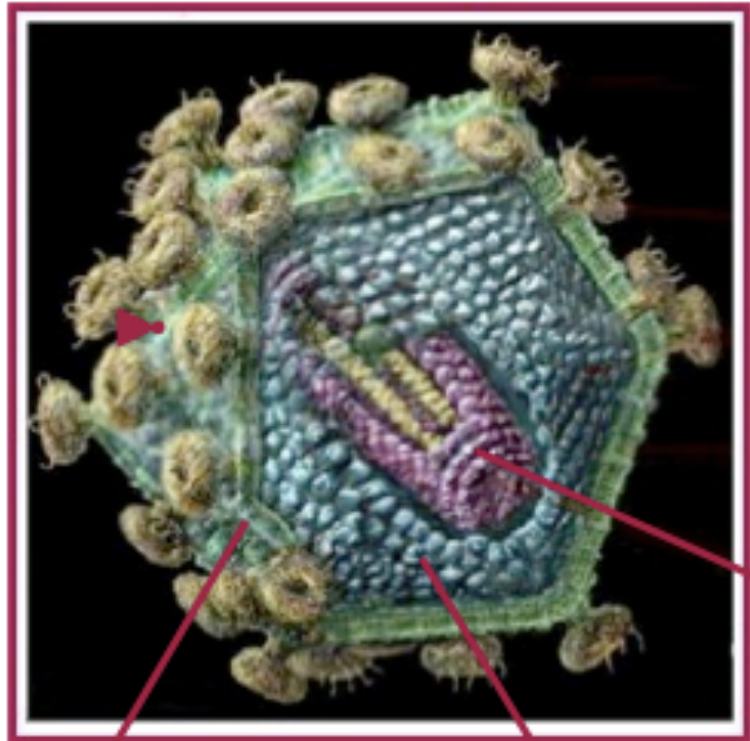
Herpes virus (DNA)

Adenovirus (DNA)

Virús Oncogénicos

Vírus de RNA – HTLV

Vírus Linfotrópicos de células T Humanas



Família: *Retroviridae*

Subfamília: *Orthoretrovirinae*

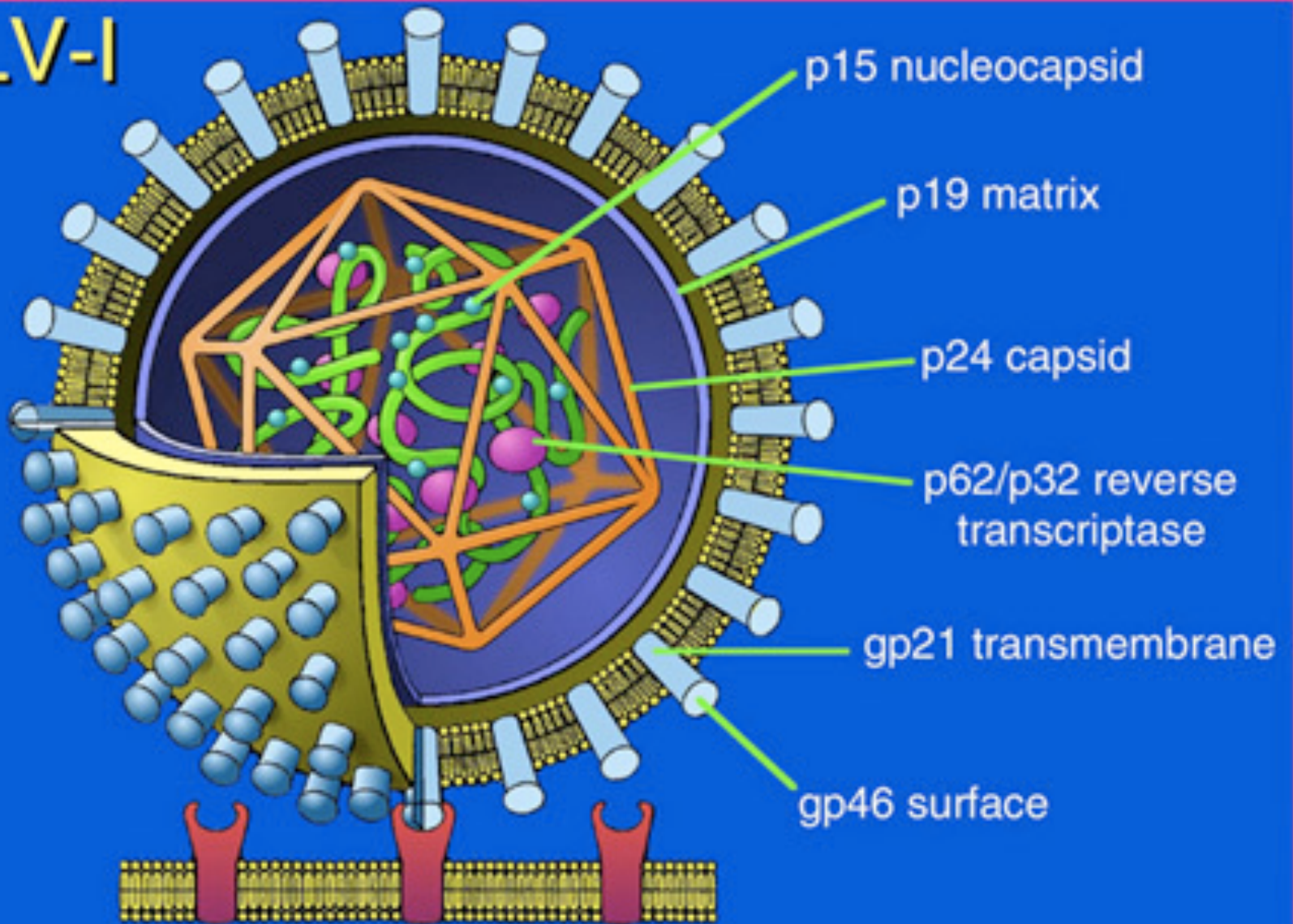
Gênero: *Deltaretrovirus*

envelope

capsídeo

nucleóide

HTLV-I



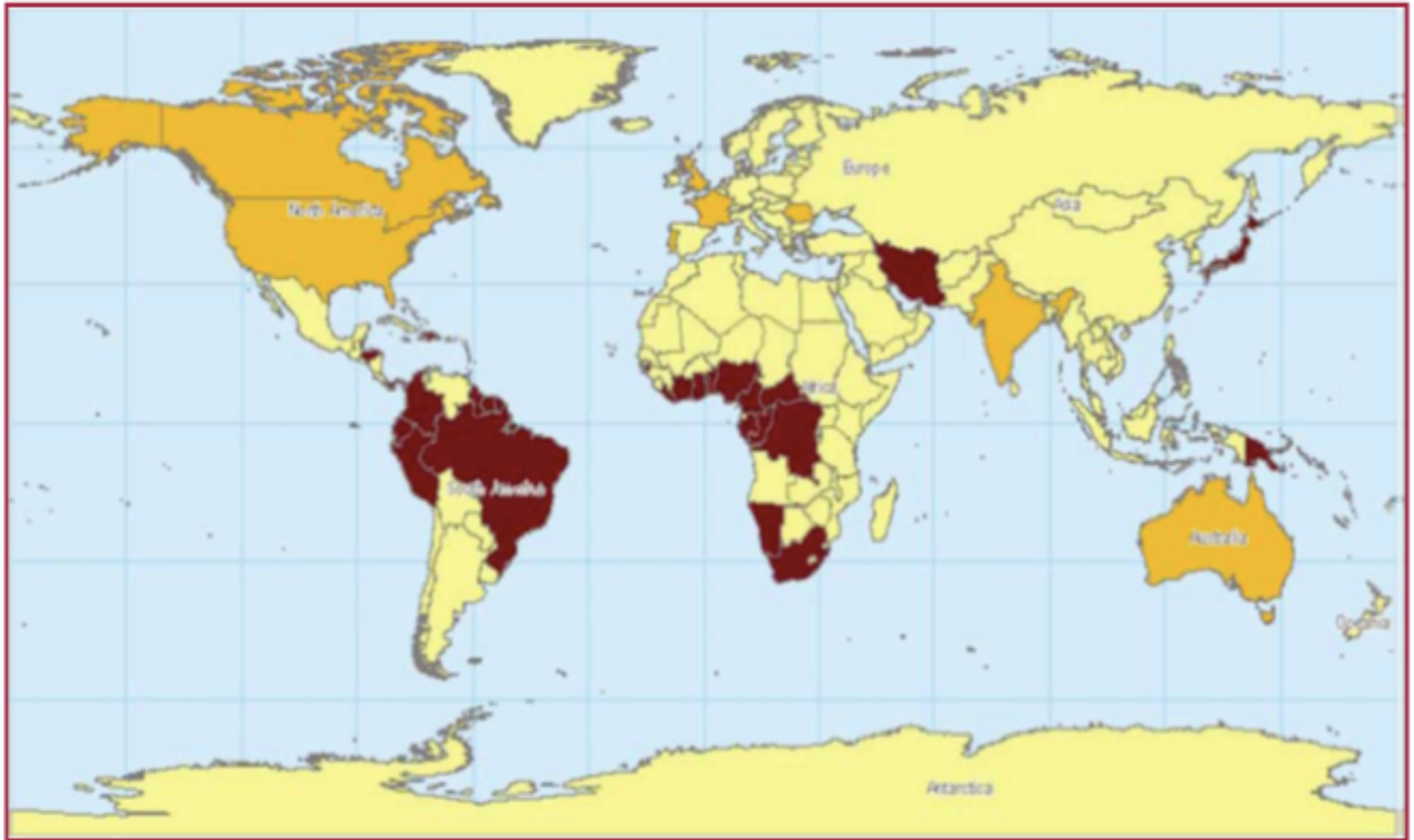
Vírus de RNA – HTLV

Vírus Linfotrópicos de células T Humanas

- Primeiro retrovírus descrito em humanos
- No mundo: 15 a 20 milhões de pessoas infectadas pelo HTLV-1
- Regiões endêmicas a prevalência aumenta com a idade e é maior no sexo feminino

Virús de RNA – HTLV

HTLV-1



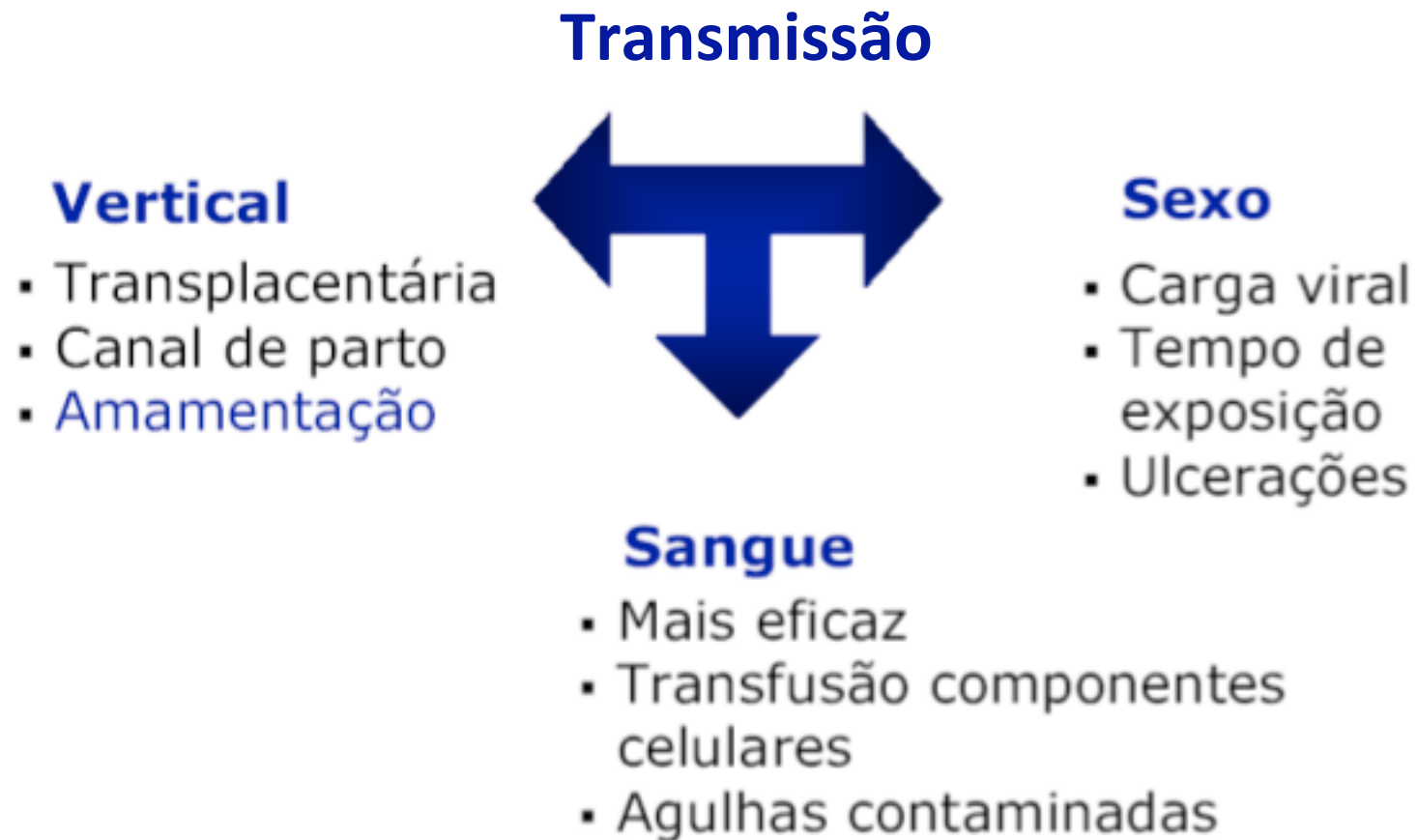
1 a 5%

< 1%

(Proietti et al, 2005)

Vírus de RNA – HTLV

Vírus Linfotrópicos de células T Humanas



Vírus de RNA – HTLV

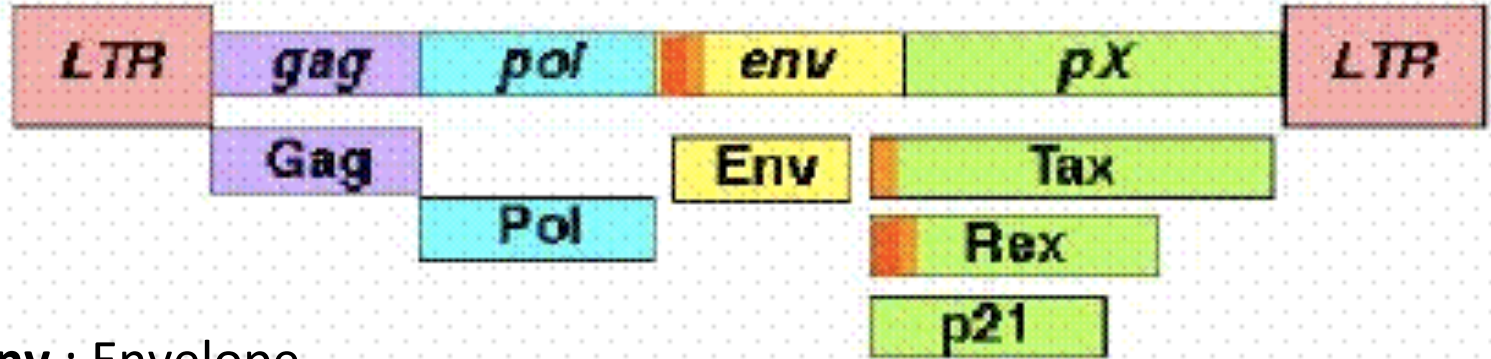
Vírus Linfotrópicos de células T Humanas

Patogénese e Imunidade

- Alvo predominante: células TCD4+ e CD8+ (10%)
- Transmissão célula-a-célula
- Integração no genoma do hospedeiro aleatória
- Transformação celular lenta

HTLV

Genoma



- Regiões env : Envelope
- Regiões 5' LTR e 3' LTR: *Long terminal repeats*
- Região pX: codifica para proteínas de regulação, tais como a [p40 \(Tax\)](#), p27 (Rex), p21, p12 e p13.
- A proteína Tax tem um papel central na transformação dos linfócitos, devido ao seu efeito pleiotrópico (liga-se ao promotor ou a *enhancers* específicos, mediante a interação com factores de transcrição).
- Tax promove também a transcrição de genes virais e celulares

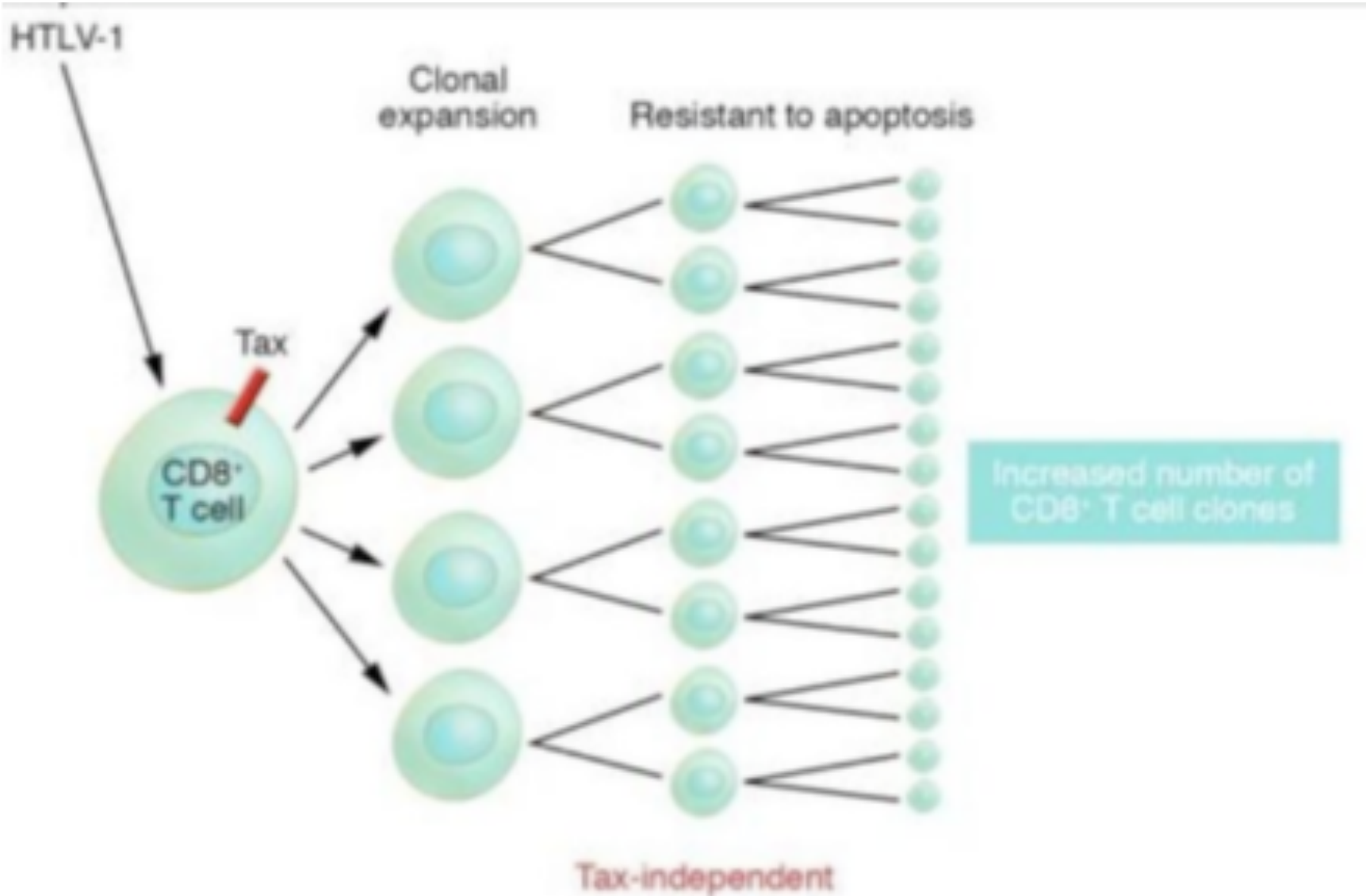
HTLV

Vírus Linfotrópicos de células T Humanas

- Causa leucemia de células T
- Codifica um oncogene viral - *tax*
- **Ativador da transcrição:** ligação factores de transcrição (TNF-kb; CREB) e co-factores (CBP) que estimulam a proliferação celular e a inibição da apoptose.
- **Inibição de proteínas supressoras de tumor:** p16INK4 e p15INK4 que potenciam a disrupção complexo Rb/E2F.
- **Inibição da maquinaria de reparação de DNA:** repressão da transcrição da DNA polimerase e inibição de DNA topoisomerase I.
- **Supressão de *checkpoint* do ciclo celular:** ligação à proteína hsMad1 levando à supressão do *checkpoint* G2/M celular

HTLV

Virus Linfotrópicos de células T Humanas



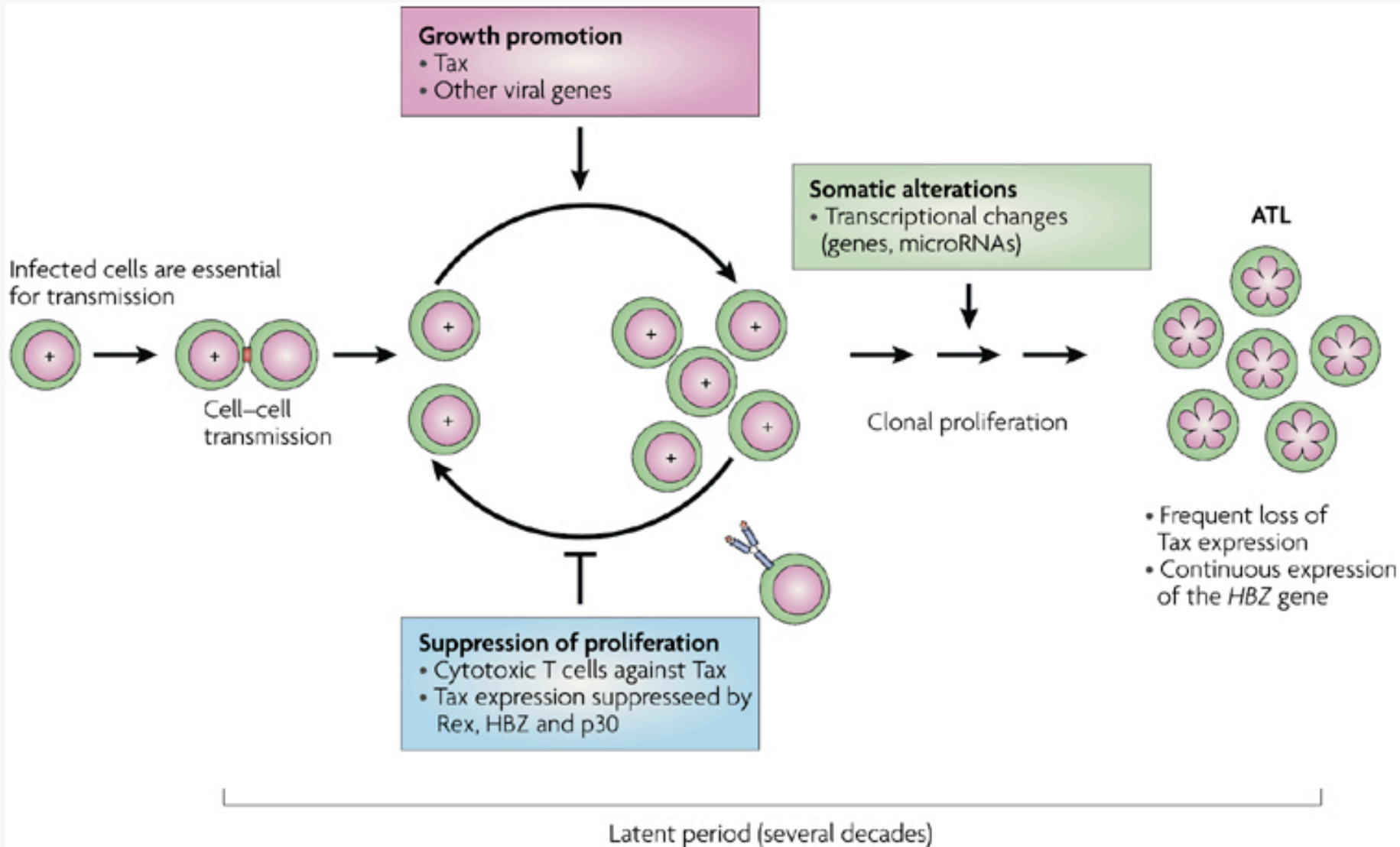
HTLV

Vírus Linfotrópicos de células T Humanas

- O crescimento celular descontrolado pode transformar neoplasticamente a célula ou promover alterações genéticas ao longo de um período extenso
- Este vírus está associado a transtornos neurológicos não-neoplásicos e outras doenças
- HTLV-I causa leucemia linfocítica aguda de células T do adulto e mielopatia associada a HTLV-I, uma doença neurológica não-oncogénica

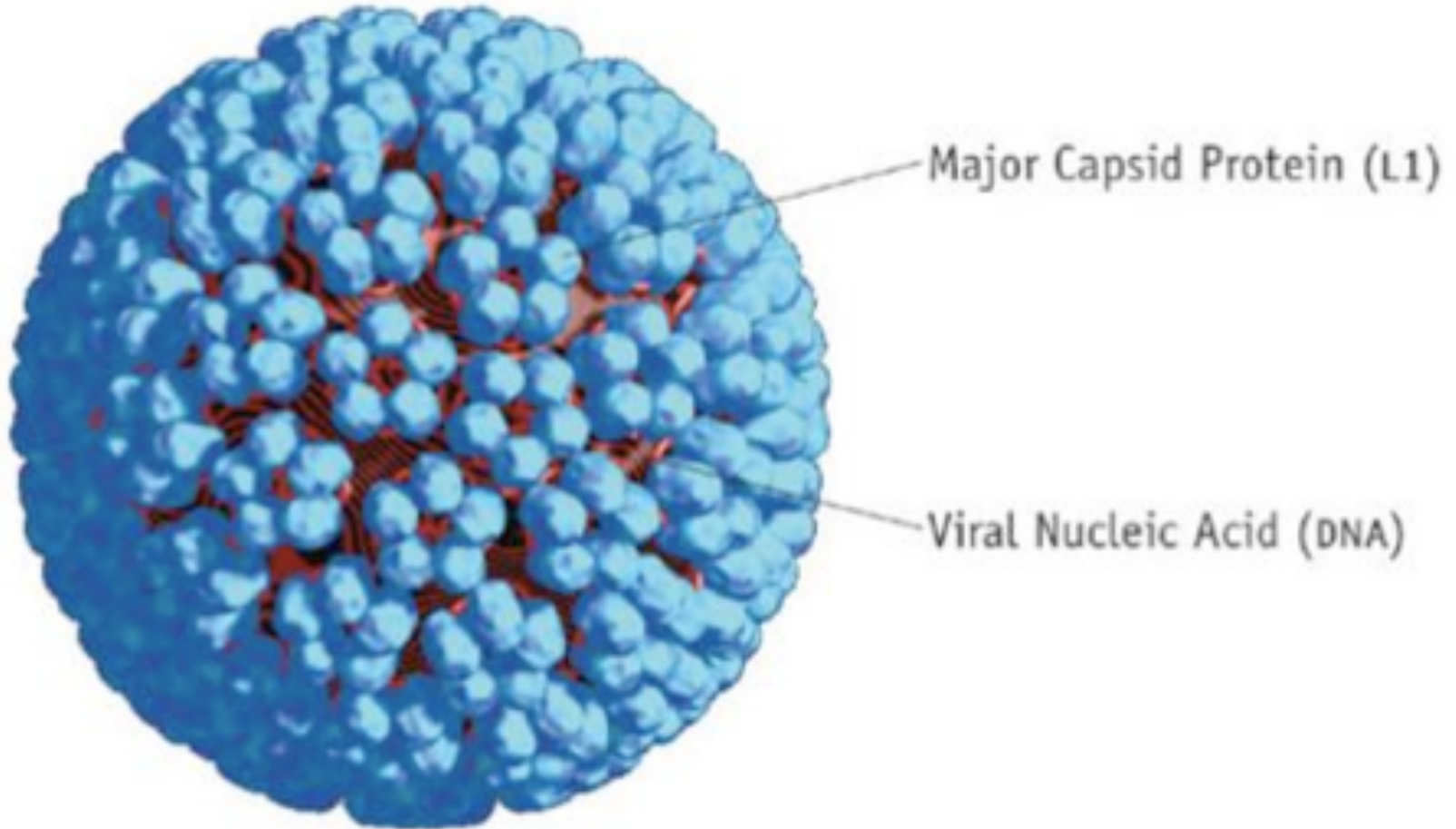
HTLV

Virus Linfotrópicos de células T Humanas



HPV

Papiloma Vírus – Cancro do colo do útero



HPV

Papiloma Vírus – Cancro do colo do útero

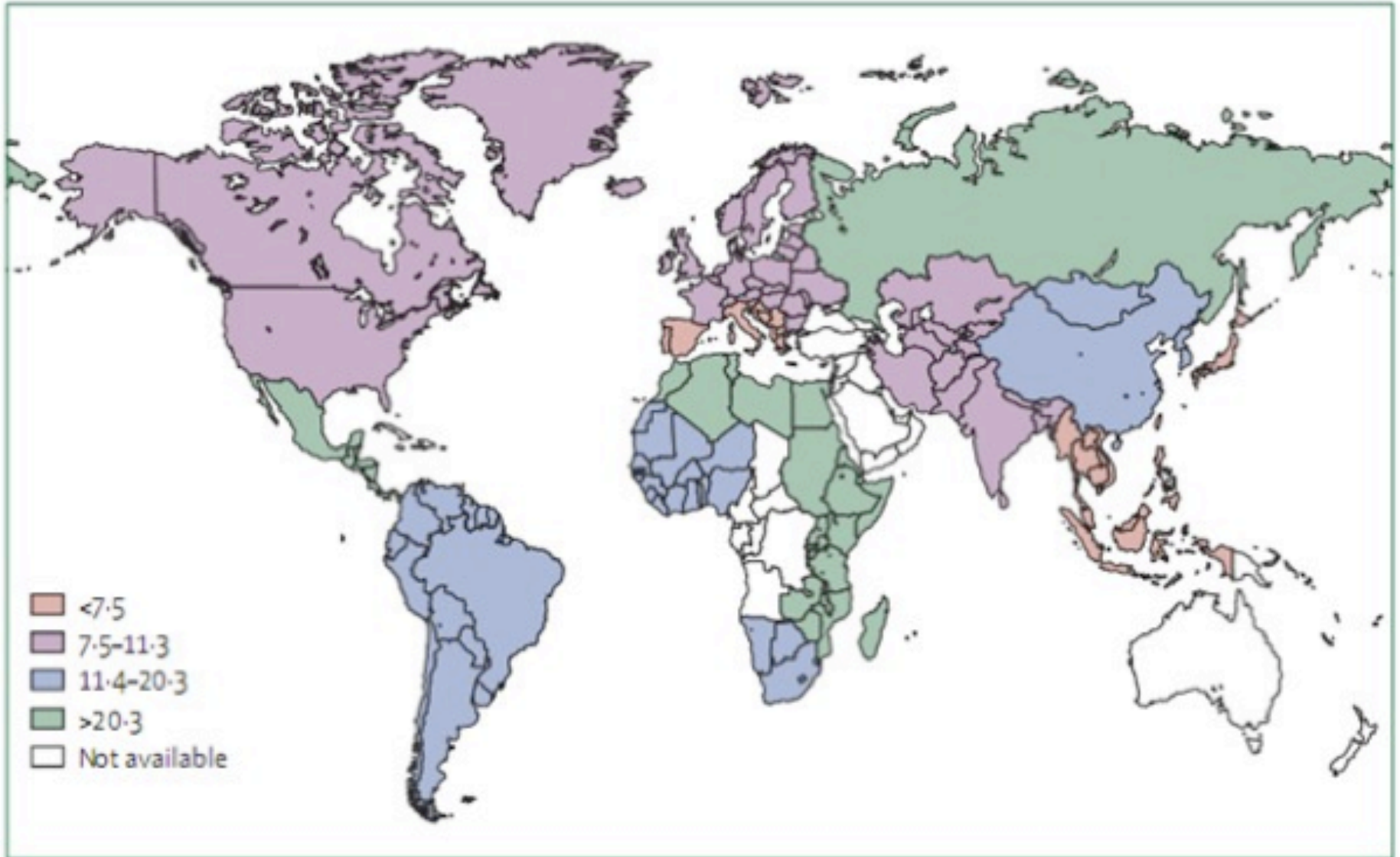
- Família *Papilomaviridae* (DNA)
- Mais comuns na zona genital: verrugas genitais ou condilomas
- Pode progredir para neoplasia intercervical caso não seja tratado precocemente

Co-fatores que elevam potencial cancerígeno:

- Número elevado de gestações
- Uso de contraceptivos orais
- Tabagismo
- HIV e outras DSTs

HPV

Papiloma Virús – Cancro do colo do útero



HPV

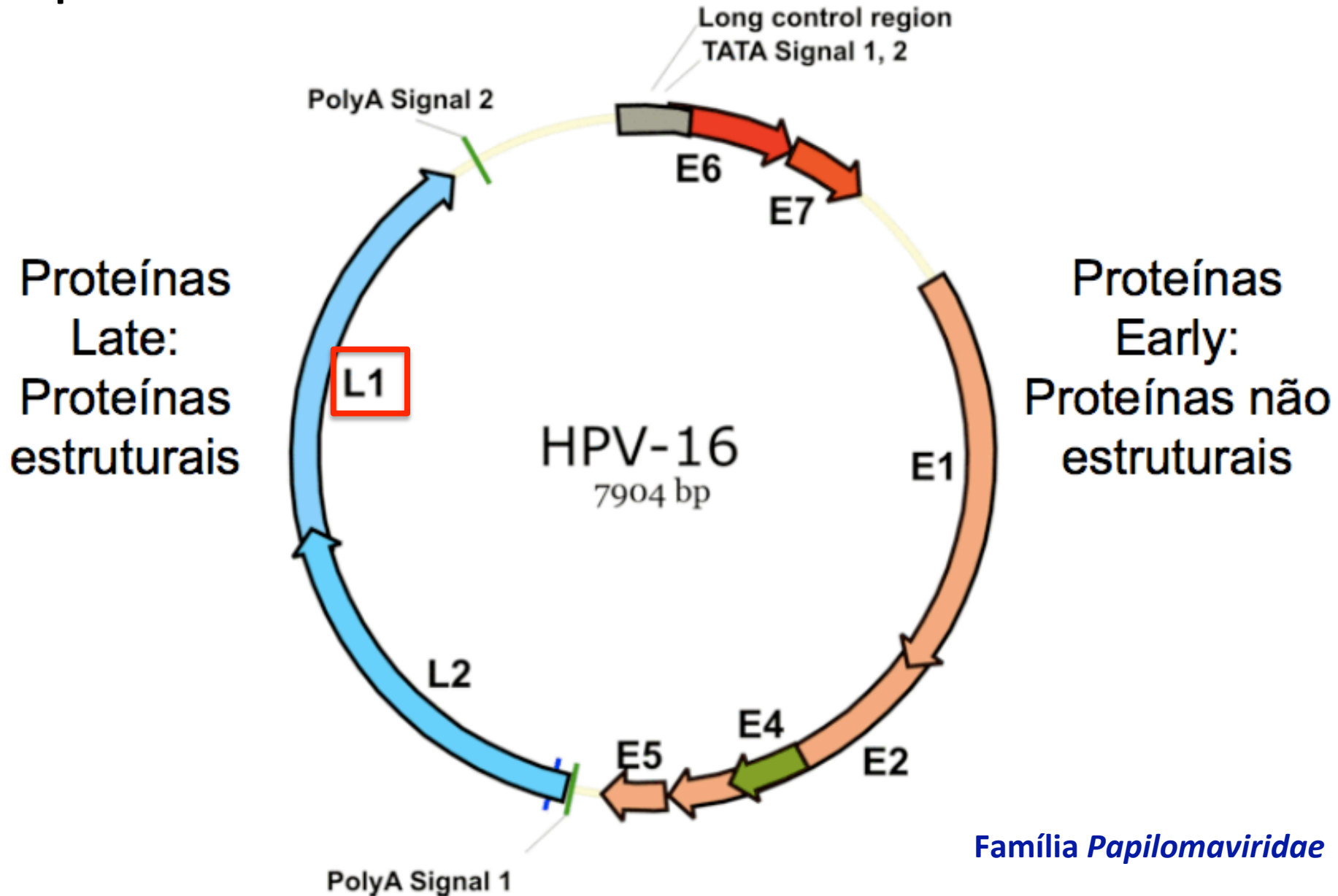
Papiloma Virús – Cancro do colo do útero

Resposta imune ao HPV

- ✓ Em 70% dos casos são desenvolvidos anticorpos em baixos níveis contra a **proteína do capsídeo L1**
- ✓ Re-infecção com outros tipos de HPV é comum, mas a re-infecção com mesmo tipo é raro
- ✓ O vírus multiplica-se apenas em **queratinócitos**. Não há reação inflamatória

HPV

Papiloma Vírus



HPV

Papiloma Vírus - Replicação

- O HPV penetra no epitélio basal do tecido
- Proteína do capsídeo L1 liga-se a um receptor de superfície celular (queratinócitos) ainda não identificado
- Após a adsorção, penetração e transporte para o núcleo, ocorre a transcrição viral
- Expressa genes que induzem a replicação celular mais frequente

HPV

Papiloma Vírus - Replicação

- À medida em que as células se dividem, diferenciam-se, trocam de função e passam a produzir queratina e outros produtos
- Algumas células tem altos níveis de replicação viral e expressam os genes tardios do vírus
- Estas produzem novos vírions e morrem
- A infecção viral acelera a diferenciação terminal das células:
verruca

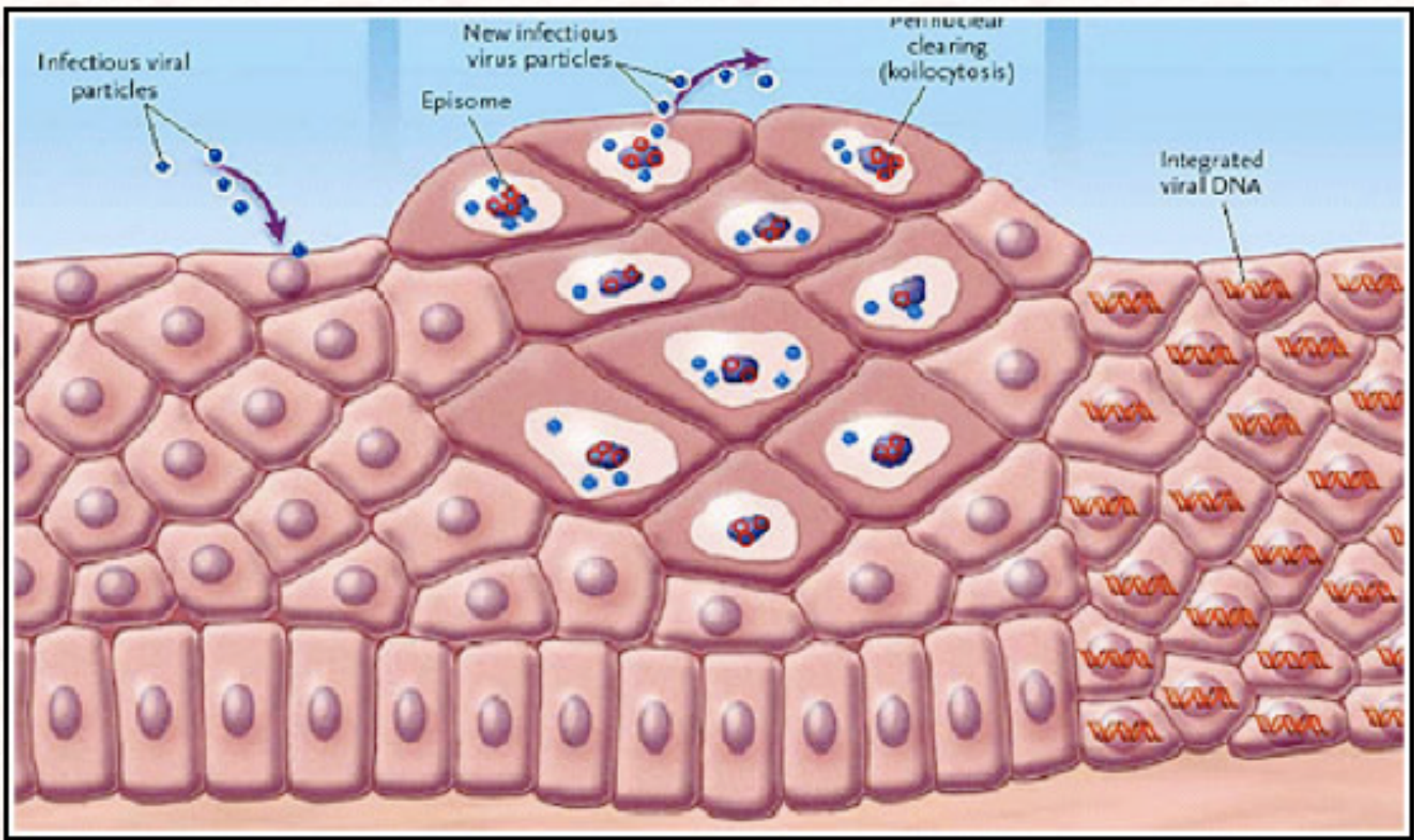
HPV

Papiloma Vírus

Desenvolvimento de Cancro

- Nos HPVs do tipo 16 e 18 as proteínas E5, E6 e E7 (*early proteins*) associam-se e inativam as proteínas **p53 e RB**
- Na célula transformada geneticamente pelo vírus, não há produção de vírus, embora continue a dividir em função do estímulo viral

Mecanismo oncogénico do papiloma vírus

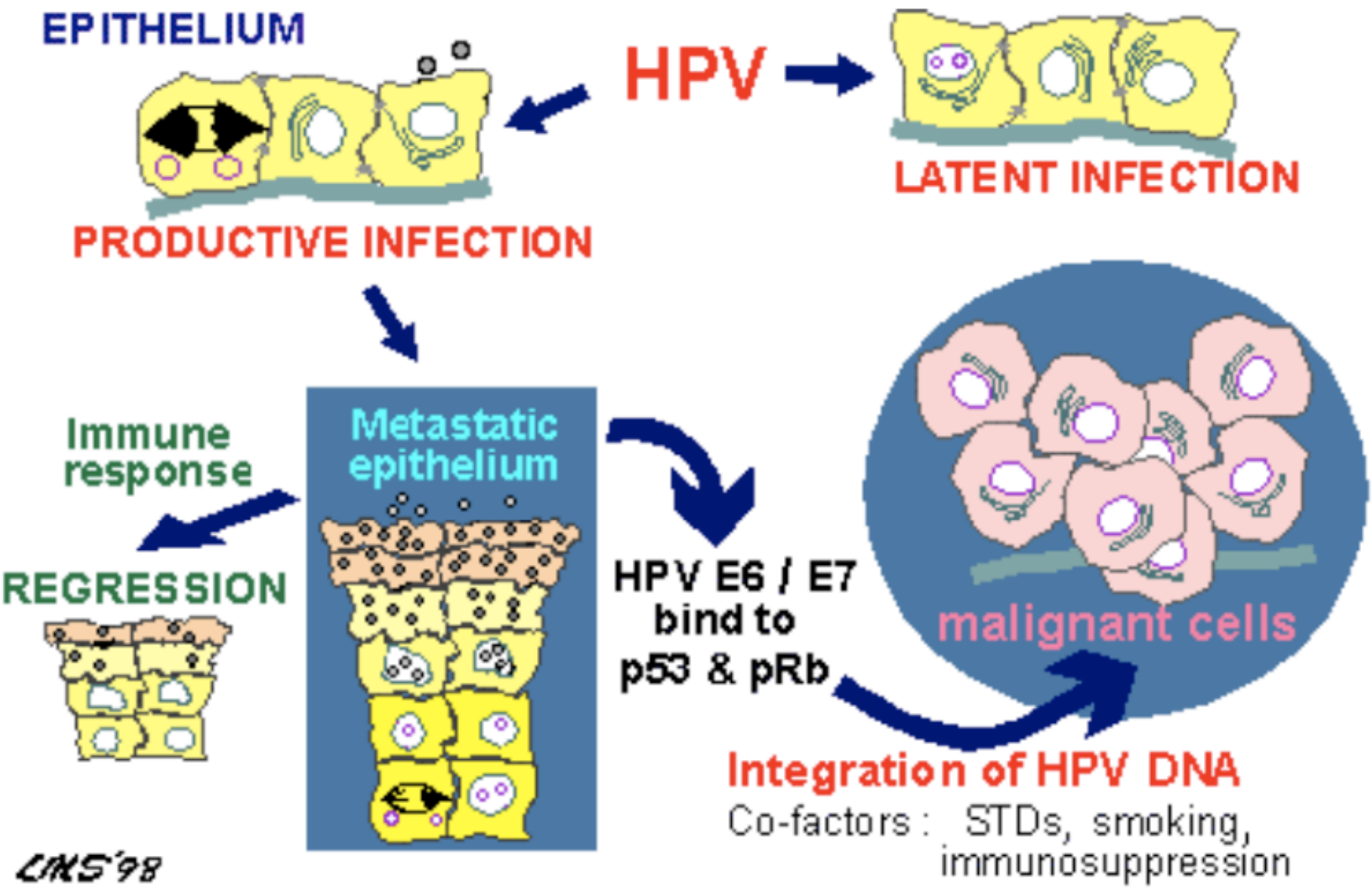


Tecido Saudável

Fase de Infecção

Integração do Vírus
no DNA do
hospedeiro

Mecanismo oncogénico do papiloma vírus



Vírus Oncolíticos

Terapia genética contra o cancro

Vírus oncolíticos naturais:

Reovírus e paramixovírus – Vírus de RNA

- “Preferem” replicar-se em células cancerígenas
- Infecção por vírus de RNA ativa a proteína *kinase R* (PKR-
“RNA-activated protein kinase”)
- Inibição síntese proteica celular e ativação da replicação viral

Vírus oncolíticos naturais:

Reovírus e paramixovírus – Vírus de RNA

Células cancerígenas:

- Uma das mutações mais frequentes é a ativação constitutiva de Ras
- Inativação de PKR (elemento da cascata de transdução do sinal iniciada por Ras)
- Permite a replicação do vírus sem reconhecimento celular – viriões lisam as células cancerígenas (ciclo lítico)

Vírus geneticamente modificados:

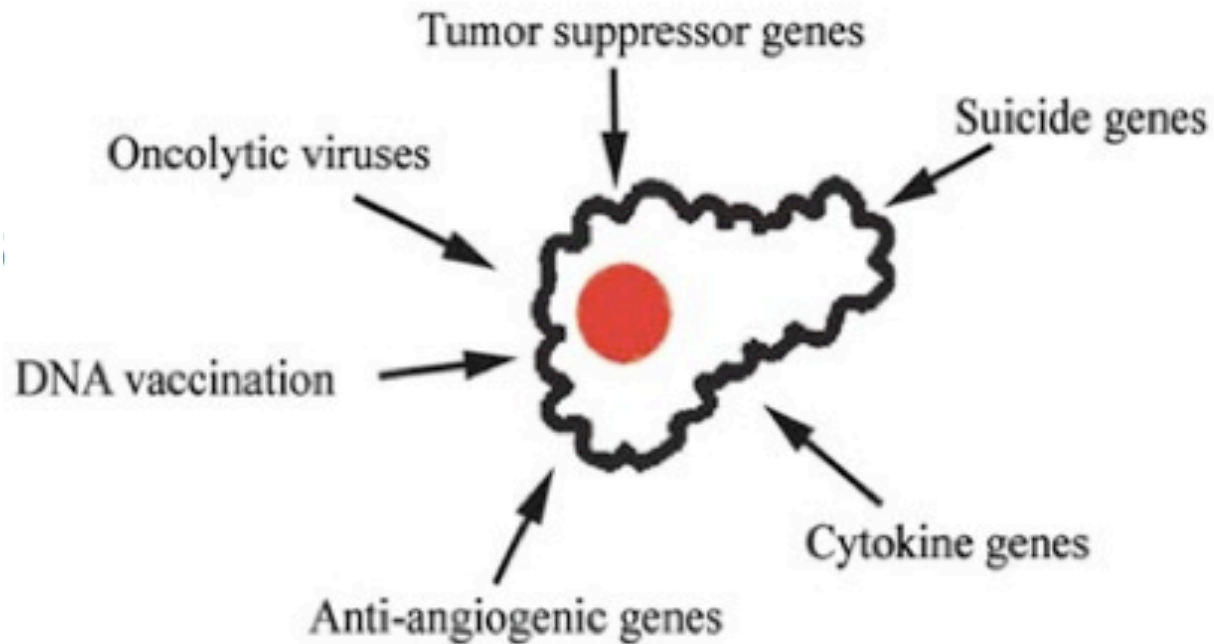
Vírus que não têm tropismo para células cancerígenas:

- ✓ Torná-los seletivos para células tumorais (não replicam células normais)
- ✓ Estabilidade genética (não reverterem ao estado *wild-type* e inserção de genes)
- ✓ Drogas antivirais eficientes na eventualidade de toxicidade

Virús Oncolíticos

Terapia Genética contra o cancro

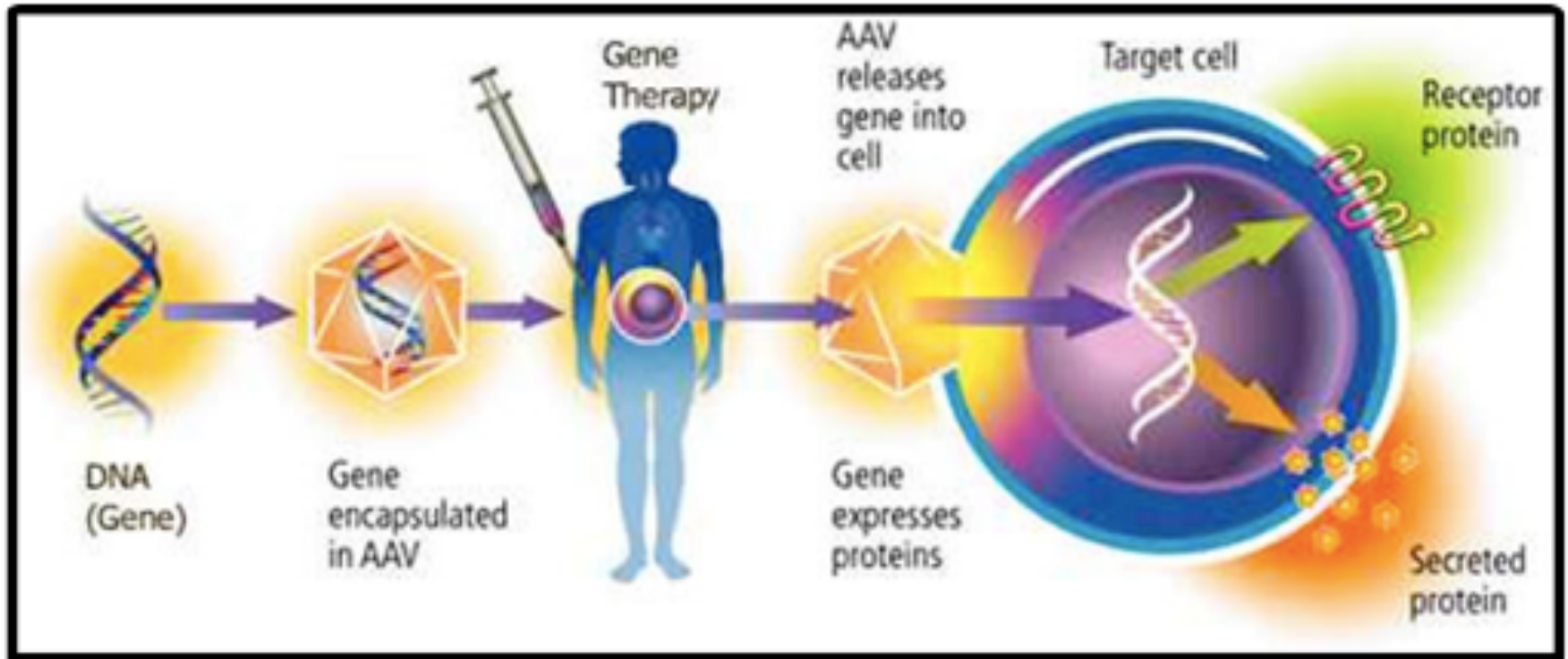
– Inserção de DNA exógeno em células cancerígenas



Virús Oncolíticos

Terapia Genética contra o cancro

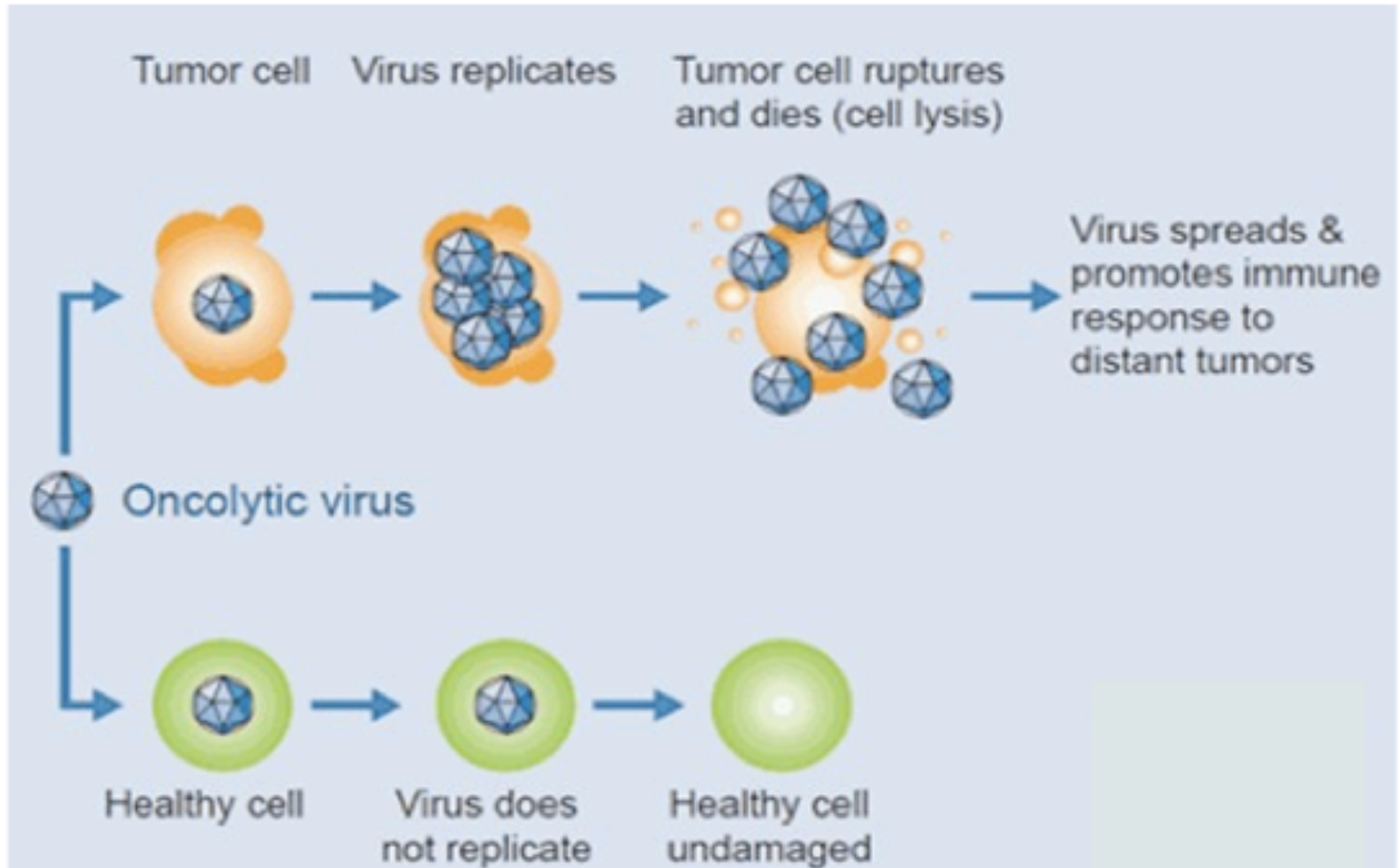
– Inserção de DNA exógeno em células cancerígenas



Virús Oncolíticos

Terapia Genética contra o cancro

- Replicação seletiva do vírus apenas em células tumorais

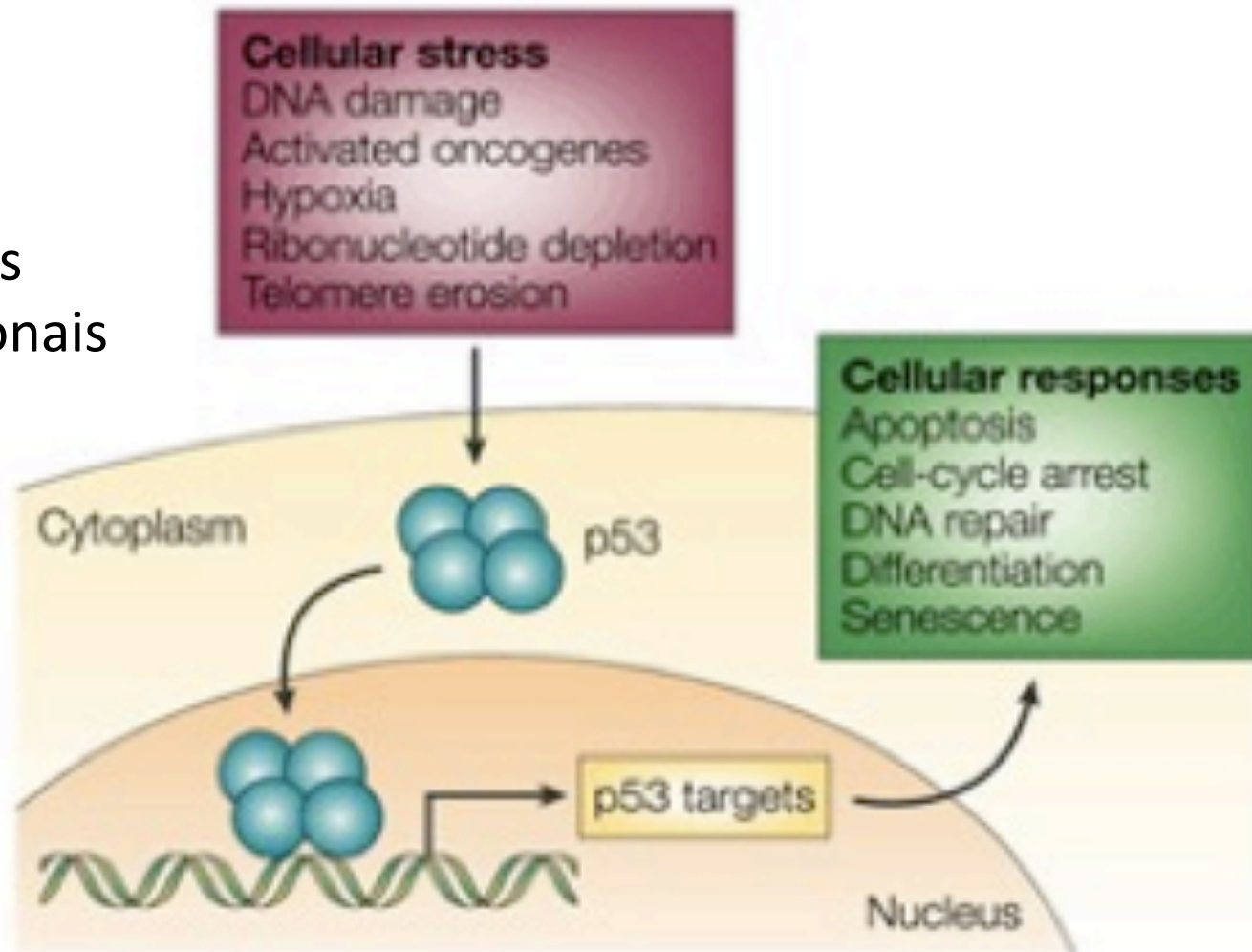


Virús Oncolíticos

Terapia Genética contra o cancro

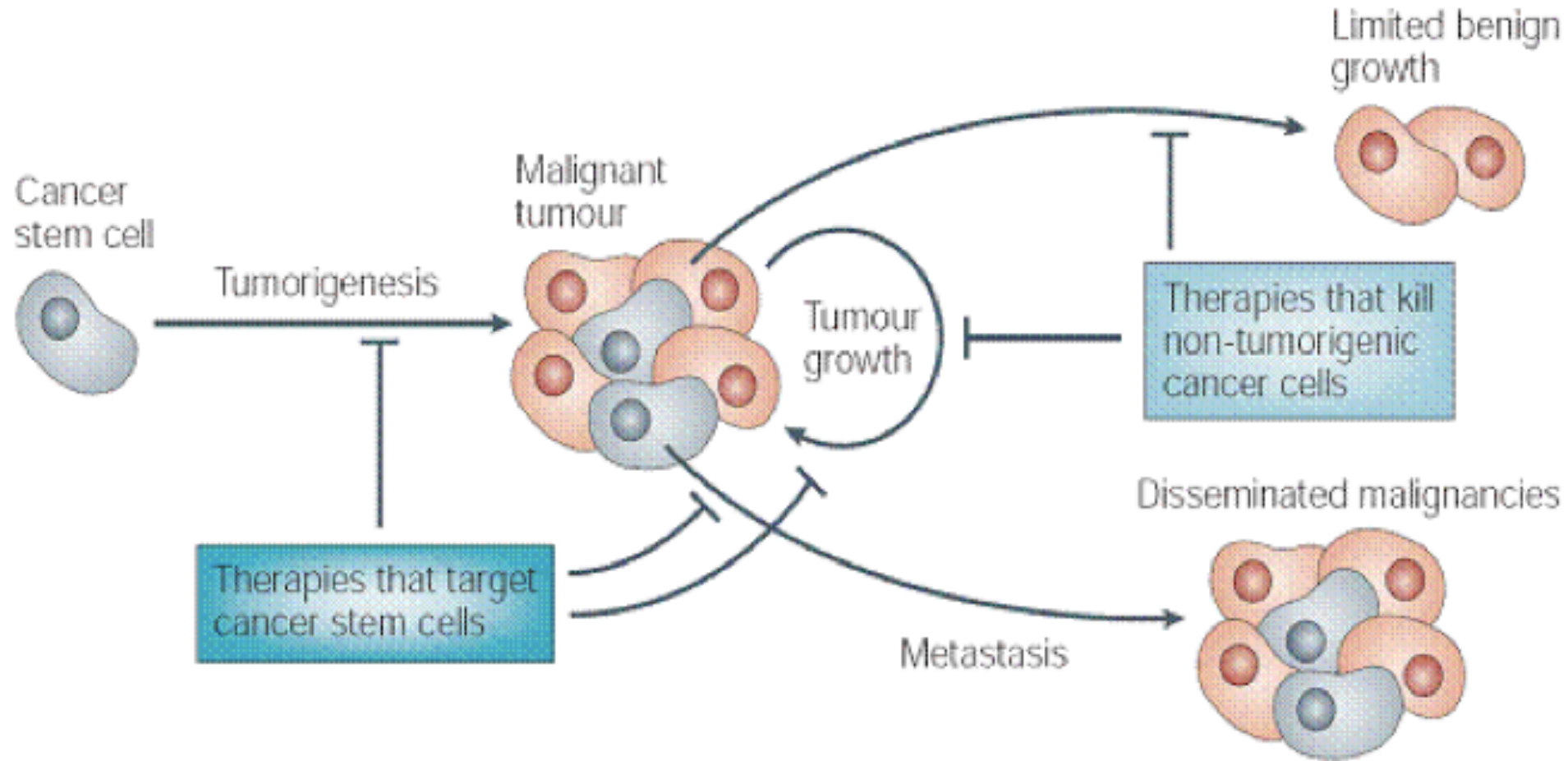
– Correção de genes
com defeitos funcionais

→ p53



Virús Oncolíticos

Terapia Genética contra o cancro



Virús Oncolíticos –

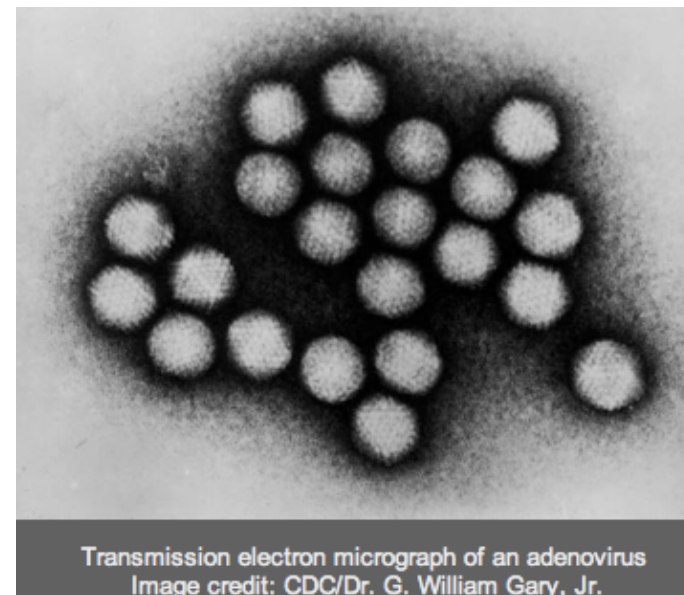
Principais vírus usados em Terapia Genética contra o cancro

- **Reovirus:** seletivo para a via *Ras* ativada
- **Poxvirus:** reconhecimento de células tumorais hepáticas
- **Herpes vírus:** reconhecimento de células tumorais da epiderme (melanoma)
- **Adenovirus:** devido à sua capacidade de mudar o tropismo

Principais vírus usados em Terapia Genética contra o cancro

ADENOVIRUS

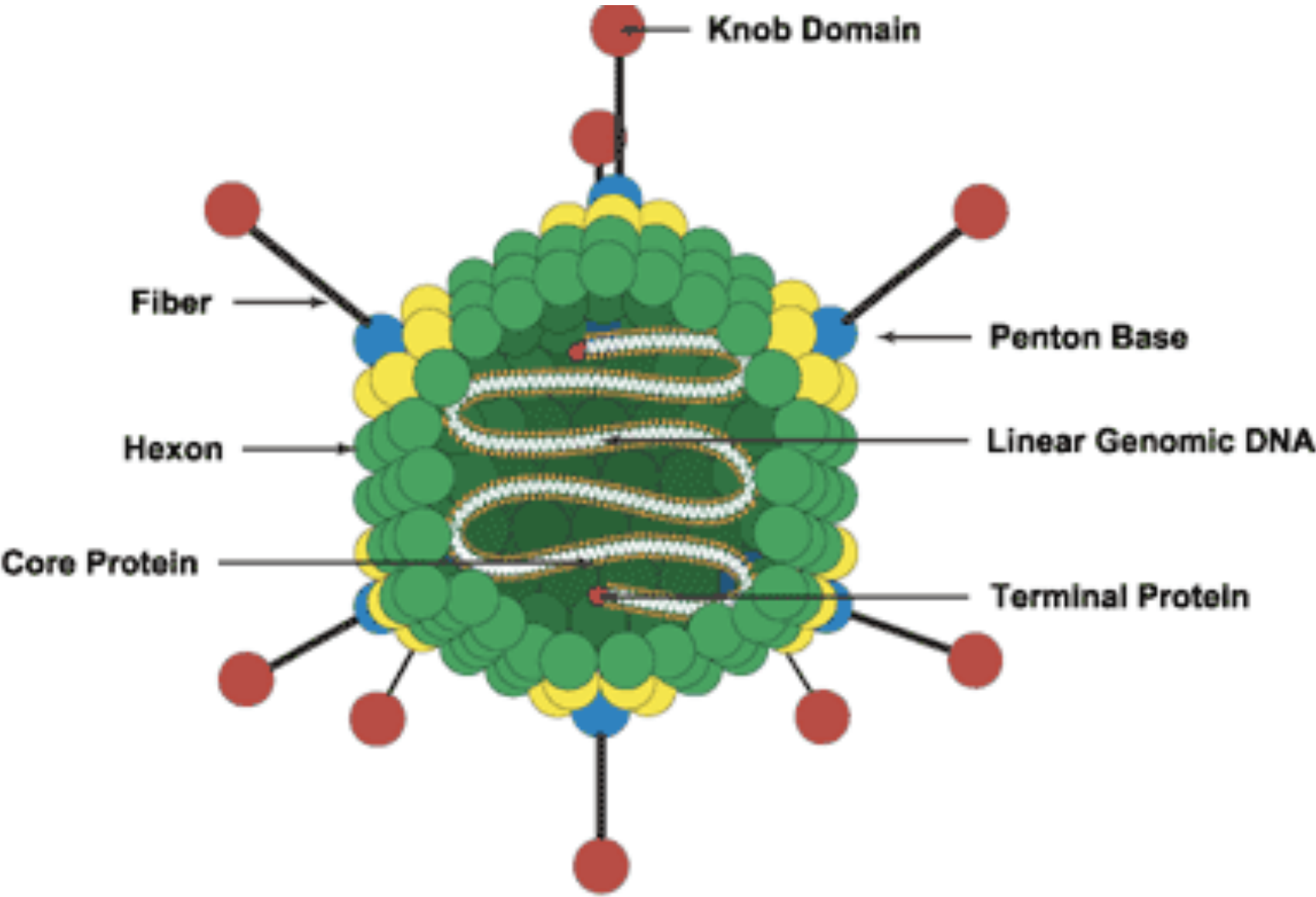
- ✓ ***Adenoviridae***: família de vírus de DNA que infetam tanto humanos como animais
- ✓ São vírus encapsulados que podem provocar infeções nas vias respiratórias, conjuntivite, cistite hemorrágica e gastroenterite.
- ✓ São muito utilizados em terapia genética



Transmission electron micrograph of an adenovirus
Image credit: CDC/Dr. G. William Gary, Jr.

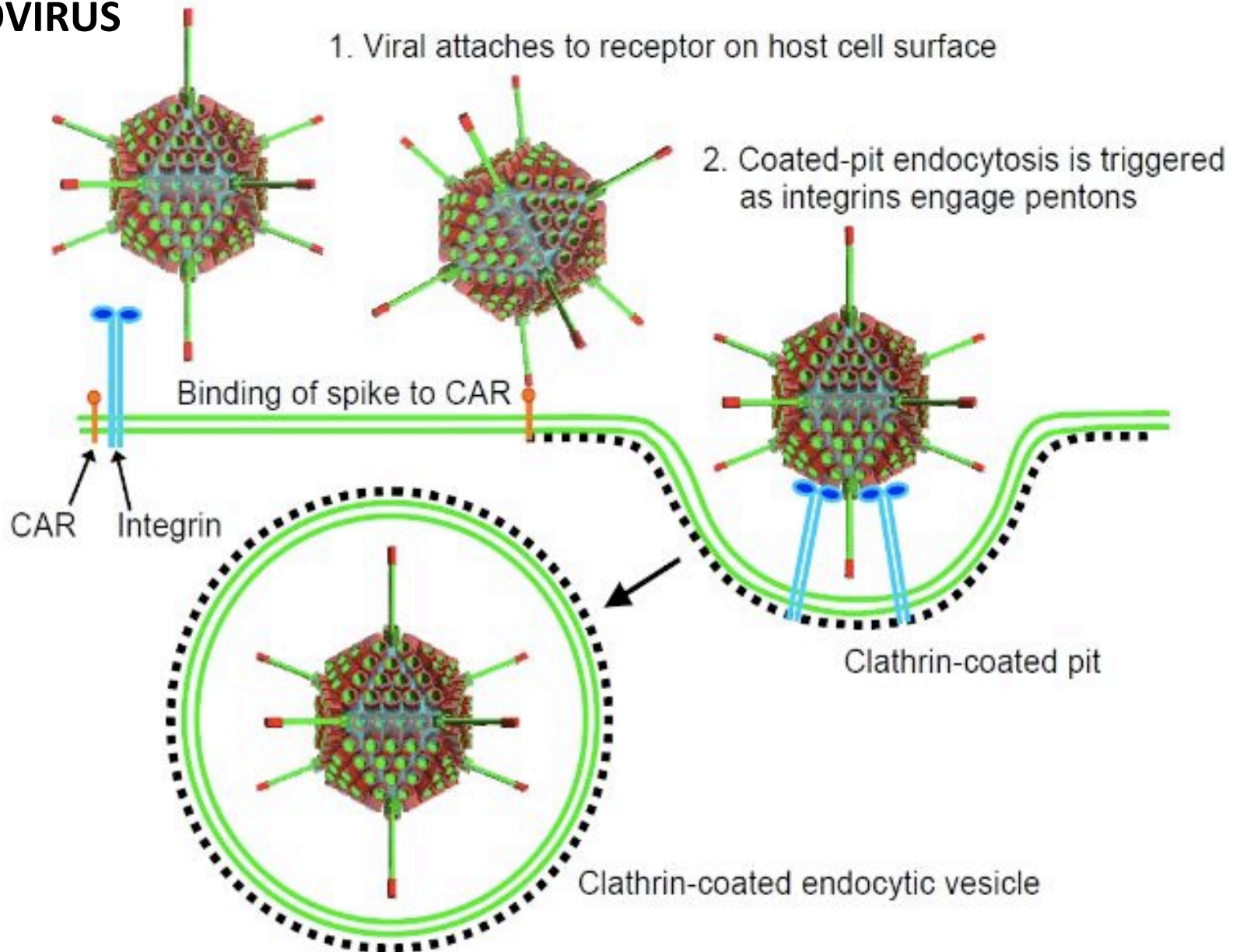
Principais vírus usados em Terapia Genética contra o cancro

ADENOVIRUS



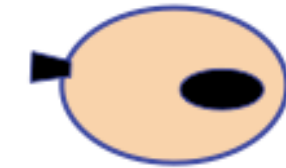
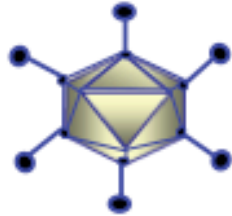
Principais vírus usados em Terapia Genética contra o cancro

ADENOVIRUS



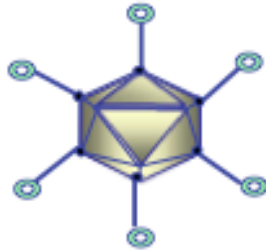
Adenovirus: capacidad de mudar o tropismo

Adenovirus clásicos



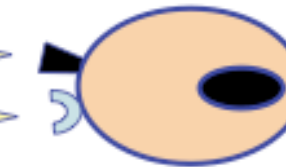
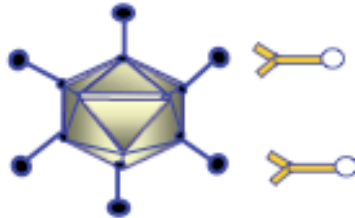
CAR

Modificación de la cápside



CAR +
receptor del
ligando

Moléculas biespecíficas

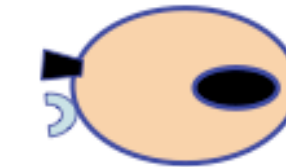
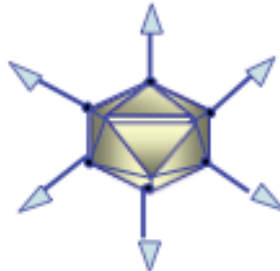


Receptor
del ligando

Nuevo tropismo



293 modificada



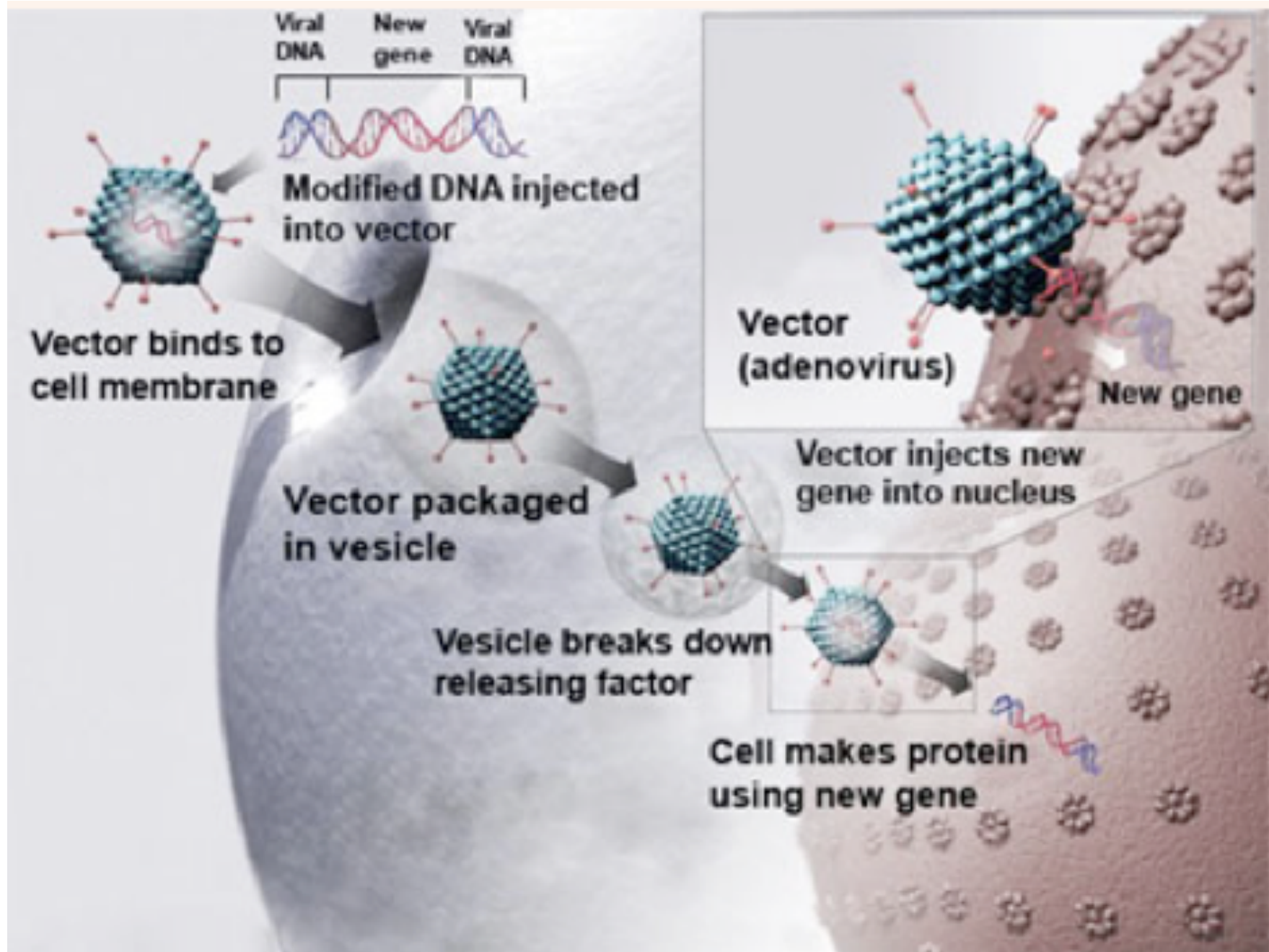
Receptor
del ligando

Virús Oncolíticos

Terapia Genética contra o cancro – Correção de genes com defeitos funcionais → p53

GENDICINE:

- p53 gene + adenovirus
- gene therapy for cancer
- medical breakthrough



Virús Oncolíticos

Terapia Genética contra o cancro

– Inserção de DNA exógeno específico em células cancerígenas



重组人 p53 腺病毒注射液 (今又生, Gendicine)

Virús Oncolíticos

Terapia Genética contra o cancro



Correção de p53 em células tumorais através de um adenovirus

GENDICINE: Adenovírus recombinante para p53 (rAd-p53), administrado por injeção

- Vírus atua como um vetor de transmissão do gene p53 nas células tumorais.
- Quando a proteína p53 é expressa nas células tumorais o crescimento é suprimido e a célula entra em apoptose
- Este fármaco foi aprovado em 2004, é o primeiro medicamento com base em terapia genética contra o cancro à venda no mundo.
- É normalmente usado como complemento de quimioterapia, radioterapia e cirurgia.

Virús Oncolíticos - Terapia Genética contra o cancro

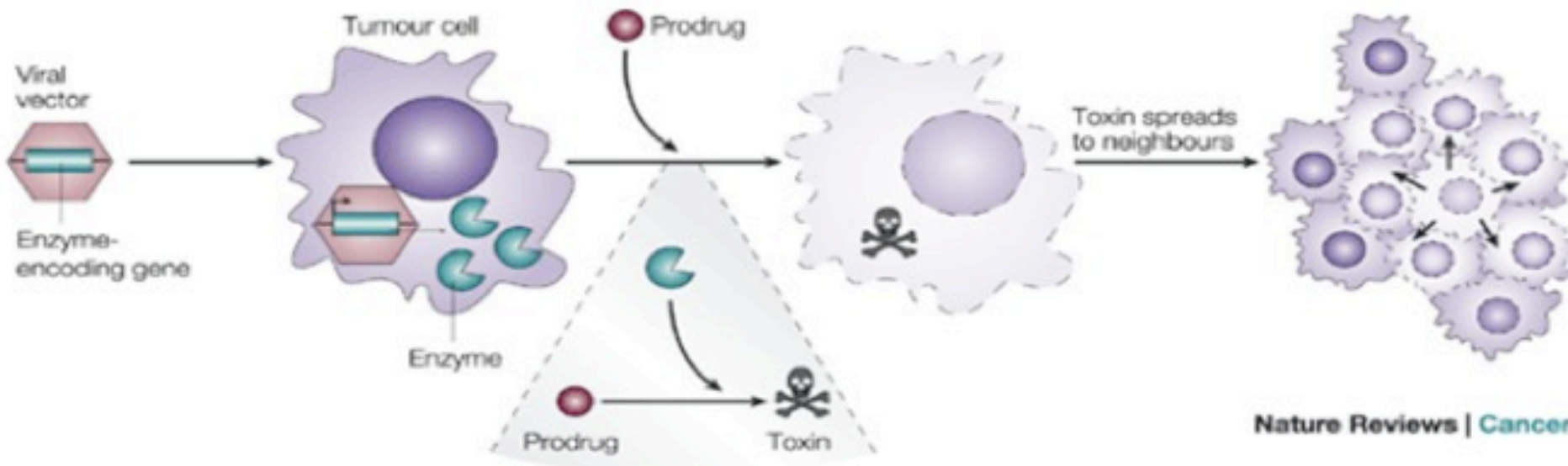
GENES SUCIDAS

– genes codificam para uma enzima que transforma um composto inofensivo num composto tóxico para a célula

Exemplo: Timida-quinase

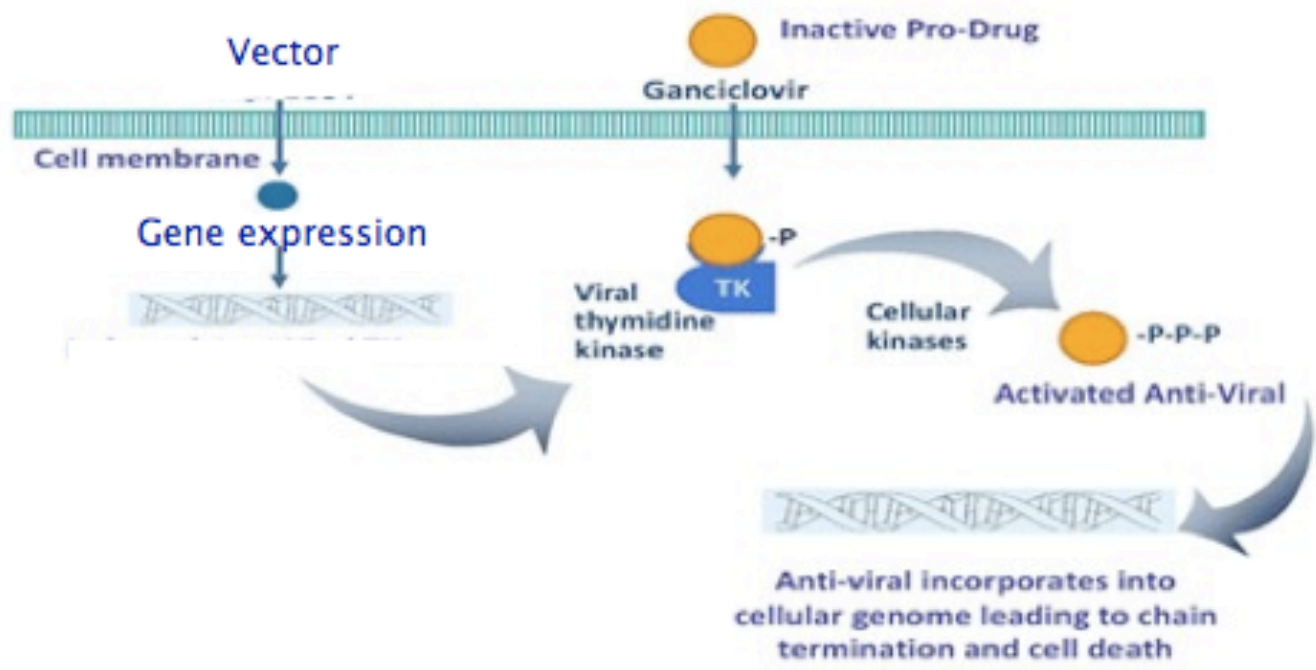
- É inserido na célula um vírus oncolítico recombinante para a enzima
- substrato (*prodrug*) da enzima é administra ao paciente
- Nas células tumorais infetadas com o vírus recombinante o substrato é transformado em tóxico pela enzima

Virús Oncolíticos - Terapia Genética contra o cancro- GENES SUCIDAS



Nature Reviews | Cancer

Timidina quinasa



Virús Oncolíticos

Terapia Genética contra o cancro

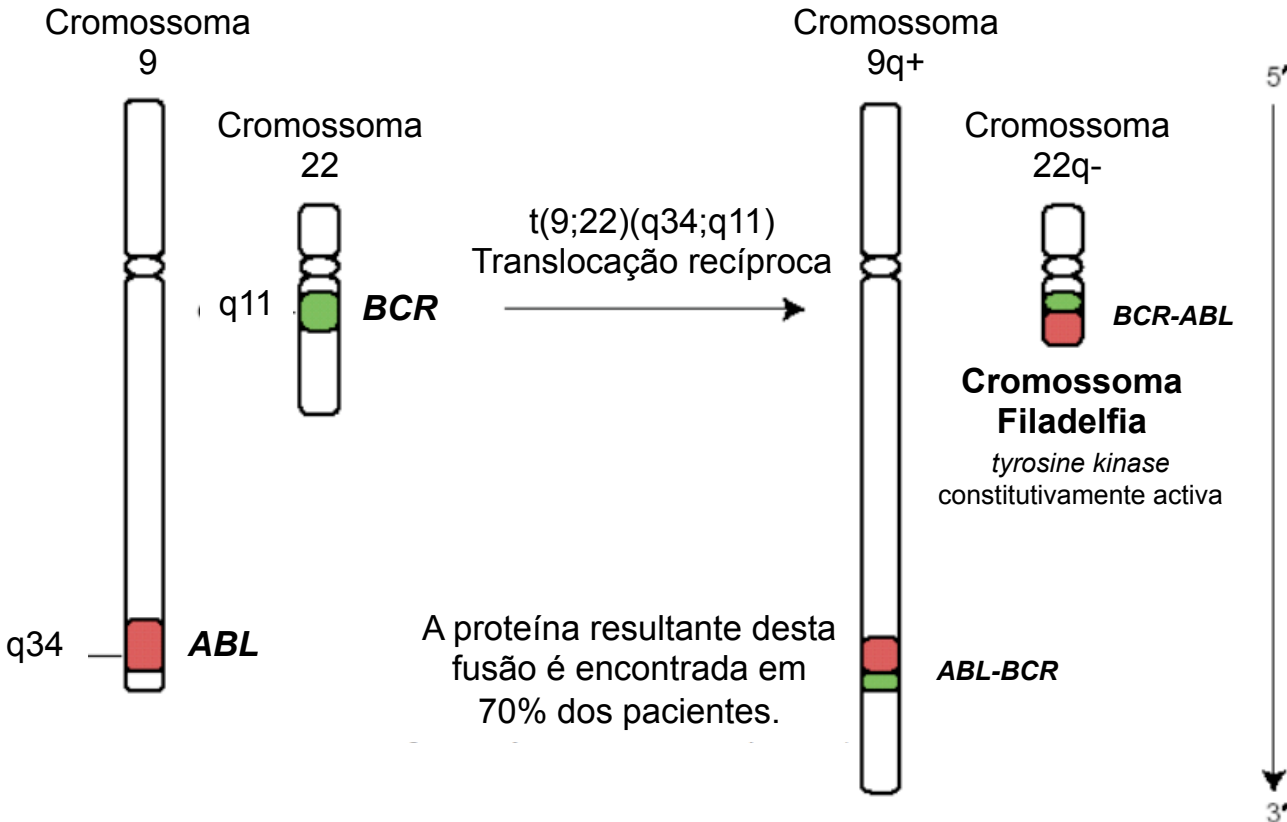
Desenvolvimento de Fármacos inibidores de oncoproteínas:

Exemplo: Terapia para Leucemia Mieloide Crónica

→ Inibidores de tirosina-quinase constitutivamente ativa (Timida quinase)

Virús Oncolíticos - Terapia Genética contra o cancro

Exemplo: Leucemia Mieloide Crónica



Chronic myeloid leukaemia (CML) is characterised by the t(9;22)(q34;q11) reciprocal translocation

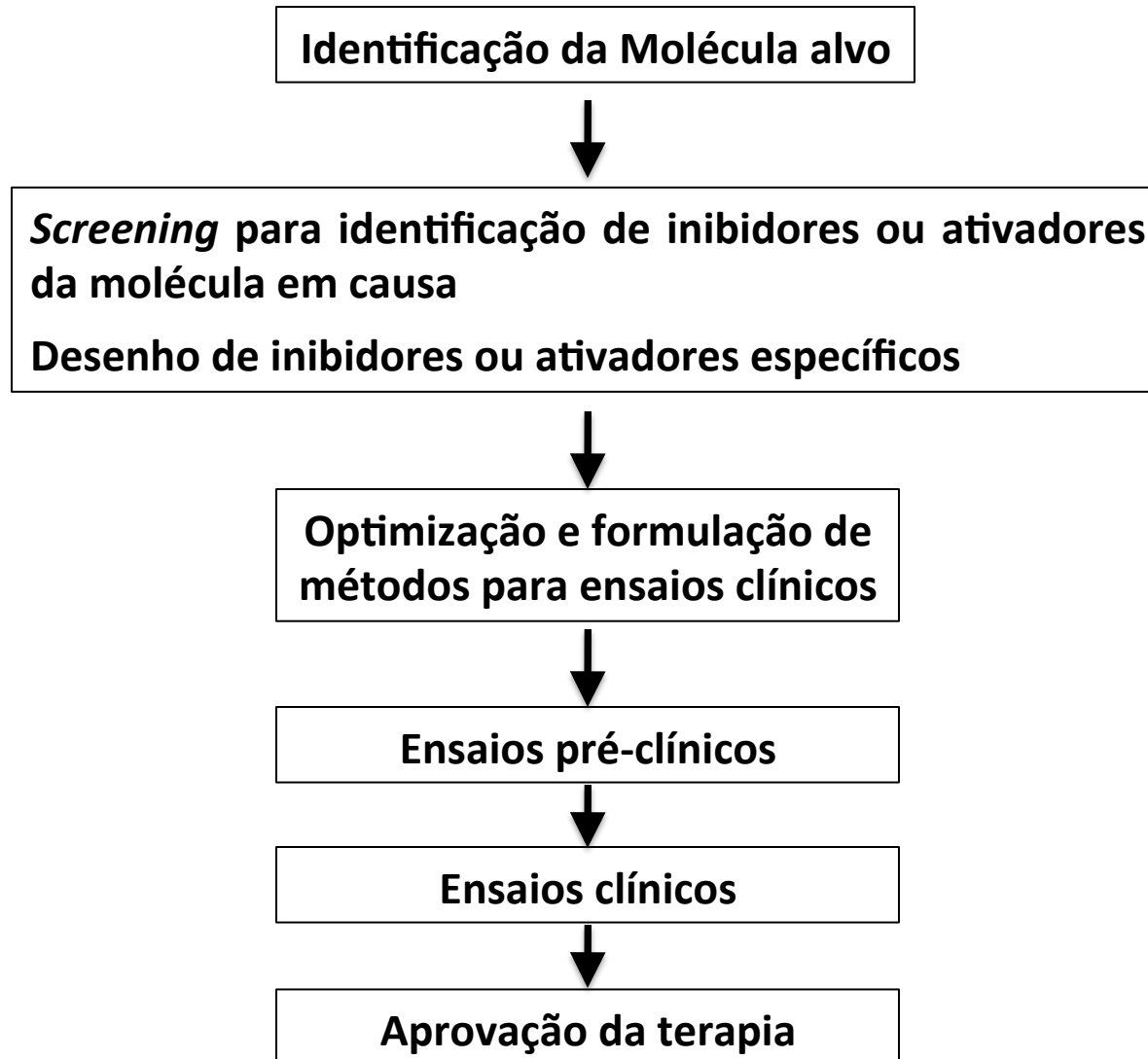
Desenvolvimento de Fármacos:

inibidores de tirosina quinase constitutivamente ativa → **Imatinib**

Virús Oncolíticos - Terapia Genética contra o cancro

Desenvolvimento de Fármacos:

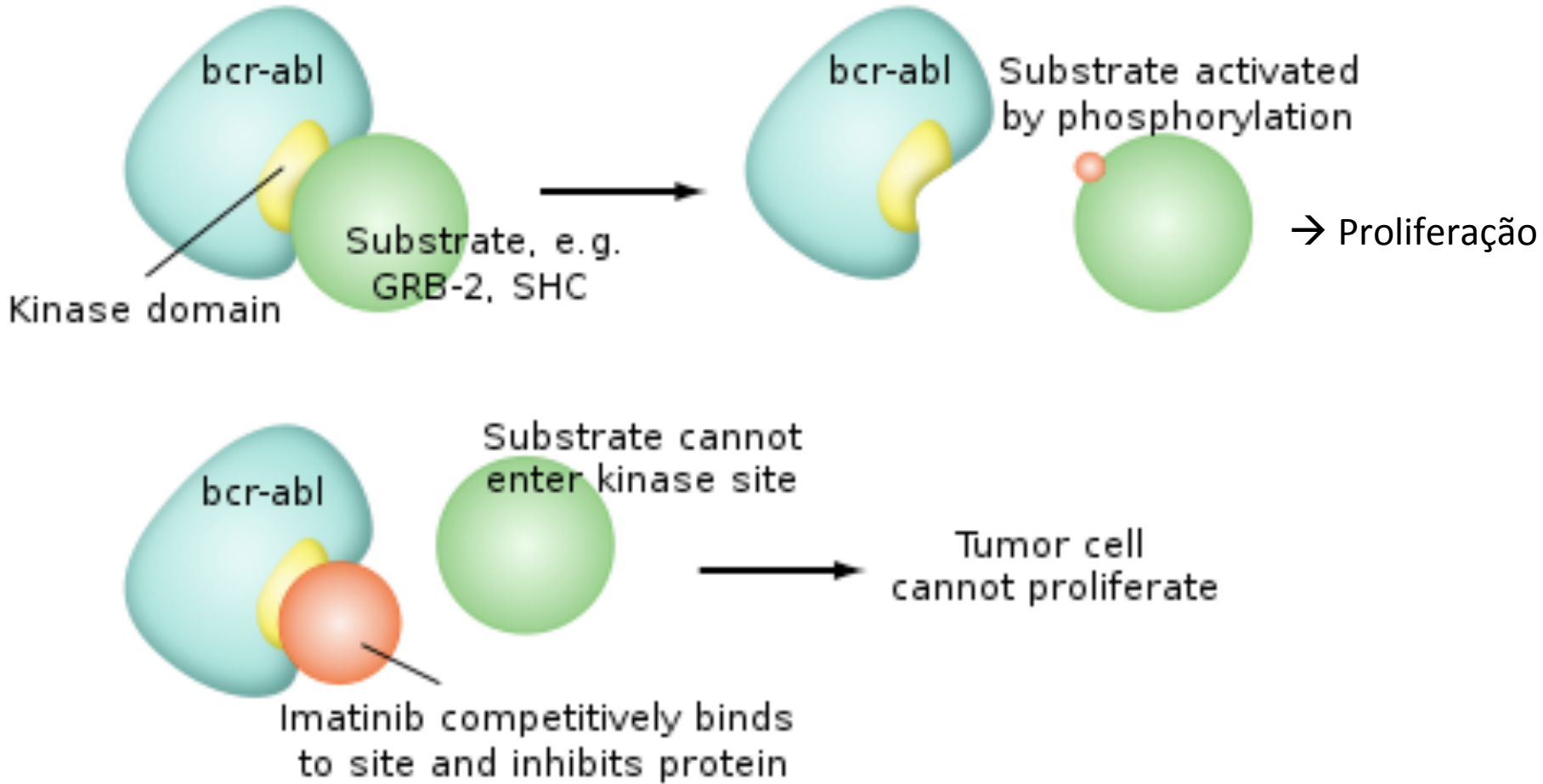
Inibidores de tirosina quinase constitutivamente ativa → Timida quinase



Virús Oncolíticos - Terapia Genética contra o cancro

Desenvolvimento de Fármacos:

Mecanismo de inibição de *bcr-abl*:



Virús Oncolíticos - Terapia Genética contra o cancro

Desenvolvimento de Fármacos:

Ensaio pré-clínicos

Validação biológica: avaliação da capacidade de atuação da proteína no sítio correcto depois de administrada:

- ✓ Inibição da actividade de tirosina-quinase em células de cultivo
- ✓ Indução da apoptose em células de pacientes
- ✓ Inibição do crescimento do tumor em rato (*mus musculus*), através da incorporação de células cancerígenas humanas (*xenografts*)

Virús Oncolíticos - Terapia Genética contra o cancro

Desenvolvimento de Fármacos:

Ensaio Clínicos

- Validação do fármaco através de ensaios em pacientes com leucemia mieloide crónica em diferente fases.

Aprovação da terapia

- Aprovação do fármaco pela *U.S. Food and Drugs* (2001)
- Aprovação na Europa e no Japão

Nome comercial: *Glivec*[®]



Bibliografia

Artigos:

- Kolch W. “Meaningful relationships: the regulation of the ras/raf/MEK/ERK pathway by protein interactions” *Biochem. J.* (2000)
- Karreth A.F et al “ C-Raf is required for initiation of lung cancer by K-Ras” *Cancer discovery* (2011)
- Artigas CG et al. “Detección de secuencias del gen BCR-ABL mediante RT-PCR en pacientes con leucemia en la IX región, Chile” *Revista médica de Chile* (2002)
- Kharas M. et al “ABL oncogenes and phosphoinositide-3-kinase: Mechanism of activation and downstream effectors” *Cancer Research* (2012)
- Arnold J. Levine and Moshe Oren. “The first 30 years of p53: growing ever more complex *Nature review* (2009)
- H Hermeking. “The miR-34 family in cancer and apoptosis”. *Cell Death and Differentiation* (2010)
- Esteller M. *F1000 Biology Reports* (2011)

Livros:

Molecular Biology of Cancer. Mechanisms, Targets, and Therapeutics. Second Edition. Lauren Pecorino. Oxford University press (2008)