

Inibidores de EBNA1 como alvos para terapias associadas a oncogênese do herpesvírus humano 4

EBNA1 inhibitors as targets for therapies associated with oncogenesis of human herpesvirus 4

DOI:10.34119/bjhrv4n5-176

Recebimento dos originais: 05/09/2021

Aceitação para publicação: 04/10/2021

Marcos Daniel Mendes Padilha

Licenciado em Ciências Biológicas Universidade da Amazônia - UNAMA Centro de Ciências Biológicas e da Saúde CCBS
Universidade Federal do Pará - UFPA
Avenida Alcindo Cacela, 287, Belém-PA, Cep: 66060-902
E-mail: maecosdaniel@yahoo.com.br

Ludmilla Ferreira Costa

Bacharel em Ciências Biológicas Universidade Federal do Pará - UFPA
Travessa Padre Eutíquio, nº 3042, apartamento 602, Bairro Condor, Cep: 66045-225
E-mail: luufca@gmail.com

Francisco Canindé Ferreira de Luna

Mestre em Neurociências e Biologia Celular Universidade Federal do Pará - UFPA
Instituto Evandro Chagas - IEC
Rodovia BR-316 KM 7/S - Levilândia 67030-000-Ananindeua/Pará/Brasil
E-mail: lunafcf@gmail.com

Murilo Tavares Amorim

Graduado em Biomedicina Centro Universitário FIBRA, UNIFIBRA, Brasil
Instituto Evandro Chagas - IEC
Rodovia BR-316 KM 7/S - Levilândia 67030-000-Ananindeua/Pará/Brasil
E-mail: murilotavares35@gmail.com

Clebson Pantoja Pimentel

Doutor em Neurociências e Biologia Celular Universidade Federal do Pará - UFPA
Universidade da Amazônia - UNAMA Centro de Ciências Biológicas e da Saúde CCBS
Avenida Alcindo Cacela, 287, Belém-PA, Cep: 66060-902
E-mail: clebsonpp@yahoo.com.br

Walter Felix Franco Neto

Mestre em Virologia Instituto Evandro Chagas - IEC
Instituto Evandro Chagas - IEC
Rodovia BR-316 KM 7/S - Levilândia 67030-000-Ananindeua/Pará/Brasil
E-mail: walter96neto@gmail.com

Jardel Fabio Lopes Ferreira

Mestre em Virologia Instituto Evandro Chagas - IEC
Instituto Evandro Chagas - IEC

Rodovia BR-316 KM 7/S - Levilândia 67030-000-Ananindeua/Pará/Brasil
E-mail: jardell.fe@gmail.com

Gustavo Moraes Holanda

Doutor em Virologia Instituto Evandro Chagas - IEC
Universidade da Amazônia - UNAMA Centro de Ciências Biológicas e da Saúde CCBS
Avenida Alcindo Cacela, 287, Belém-PA, Cep: 66060-902
E-mail: holandagm@gmail.com

RESUMO

Introdução: O vírus Epstein-Barr (EBV) ou Herpesvírus Humano 4 (HHV-4) está associado ao carcinoma nasofaríngeo e diferentes malignidades em pacientes infectados, as taxas de mortalidade destacam a necessidade de pesquisas direcionadas a oncogênese causada pelo vírus. A proteína antígeno nuclear 1 (EBNA1) tem sido alvo de pesquisas pela função de latência e replicação durante o processo oncogênico e inibidores anti-EBNA1 e EBV estão sendo amplamente testados. **Metodologia:** Esta pesquisa é uma revisão sistemática descritiva, a plataforma de busca para análise dos artigos foi o NCBI e lista de referência dos artigos selecionados. Os termos considerados foram: Antígenos nucleares EBV, Carcinoma nasofaríngeo, EBNA1, Inibidores de EBNA1. Os artigos escolhidos obedeceram o ano de 1998 a 2020. **Objetivos:** Analisar possíveis inibidores de EBNA1 e EBV sobre oncogênese do HHV-4. **Resultados e discussão:** Roscovitina, Poliamidas, Inibidores de Hsp90, Compostos SC7,11 e 19 e Antígenos direcionados para CDs *in vivo* e *ex vivo* tiveram alta eficiência em modelos experimentais de células infectadas para possíveis terapias anti-EBV e EBNA1. **Conclusão:** As pesquisas no uso de inibidores EBNA1 e EBV apresentaram resultados promissores onde as células que foram expostas a infecção causaram redução da replicação e depleção de genomas EBV. Outra descoberta que potencializa uma cura para EBV e bloqueio da atividade de latência EBNA1 é o uso de terapias adjuvantes como os inibidores *checkpoint*.

Palavras-chave: Antígenos nucleares EBV, Carcinoma nasofaríngeo, EBNA1, Inibidores de EBNA1

ABSTRACT

Introduction: Epstein-Barr virus (EBV) or Human Herpesvirus 4 (HHV-4) is associated with nasopharyngeal carcinoma and different malignancies in infected patients, mortality rates highlight the need for research targeting oncogenesis caused by the virus. Nuclear antigen protein 1 (EBNA1) has been the target of research for latency and replication function during the oncogenic process and anti-EBNA1 and EBV inhibitors are being extensively tested. **Methodology:** This research is a descriptive systematic review, the search platform for analysis of the articles was the NCBI and reference list of the selected articles. The terms considered were: EBV nuclear antigens, nasopharyngeal carcinoma, EBNA1, EBNA1 inhibitors. The articles chosen followed the year 1998 to 2020. **Objectives:** To analyze possible Inhibitors of EBNA1 and EBV on oncogenesis of HHV-4. **Results and discussion:** Roscovitine, Polyamides, Hsp90 Inhibitors, Compounds SC7,11 and 19 and Antigens targeted to CDs *in vivo* and *ex vivo* had high efficiency in experimental models of infected cells for possible anti-EBV and EBNA1 therapies. **Conclusion:** Research on the use of EBNA1 and EBV inhibitors showed promising results where cells that were exposed to infection caused reduced replication and depletion of EBV genomes. Another discovery that enhances a cure for EBV and blockade of EBNA1 latency activity is the use of adjuvant therapies such as checkpoint inhibitors.

Keywords: Nuclear antigens EBV, Nasopharyngeal carcinoma, EBNA1, EBNA1 inhibitors

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma nasofaríngeo (CN) está associado ao vírus Epstein-Barr (EBV) em regiões que é endêmico, incluindo sul da China e sudeste da Ásia. As altas taxas de mortalidade destacam a urgência de tratamentos eficazes, pesquisas translacionais para desenvolver terapias em particular inibidores da proteína antígeno nuclear 1 (EBNA1) tem sido intensamente explorados, por causa das funções dessa proteína na latência e replicação do genoma viral em células com CN. (HAU et al, 2020).

Vírus oncogênicos possuem estratégias que interrompem as vias metabólicas das células infectadas, o material genético do vírus passa por diversos processos de replicação com a divisão celular, escapando da vigilância imunológica e inibindo a apoptose. (EL-SHARKAWY et al, 2018). A persistência viral é alcançada pela integração do genoma viral ao hospedeiro ou pela expressão de proteínas do vírus que segregam genoma exógeno em células filhas durante o processo mitótico. (MORALES-SÁNCHEZ & FUENTES-PANANÁ, 2014). O EBV é mais conhecido por causar mononucleose infecciosa, sendo associado a distúrbios linfoproliferativos de células B, linfoma de Burkitt, linfoma Hodgkin, doenças linfoproliferativas em células NK, linfoma de células T periférico, cutâneo, angioimunoblástico e leucemia. (MUI et al, 2017).

Durante a infecção latente, EBNA1 é essencial para a replicação e transcrição, imortalizando linfócitos B primários. O conceito de EBNA1 como alvos de drogas é novo, a Roscovitina um potente inibidor da cinase dependente de ciclina (CDK) tipos 1,2,5 e 7, inibem o ponto Ori do epissoma pela supressão da fosforilação de CDK de EBNA1 na serina 393. (GIANTI et al, 2016). A fosforilação e outras modificações pós-traducionais influenciam as atividades EBNA1 incluindo funções de transcrição e regulação, embora os mecanismos permaneçam pouco compreendidos. (DUELLMAN et al, 2009).

Yasuda et al (2011) comprovou *in vitro* e *in vivo* que poliamidas, ligantes de DNA específicos para sequências, podem interferir na ligação de vários fatores transcricionais e sequências adjacentes de reconhecimento EBNA1, além de coibir a proliferação de linhagens de células linfoblastóides pela erradicação do epissoma do EBV suprimindo a expressão de genes de transformação viral após infectar células mononucleadas de sangue periférico humano com EBV, interrompendo a imortalização de células B mediadas por EBV.

Os inibidores de Hsp90 diminuem a expressão e tradução de EBNA1, em células com infecção latente, esses inibidores impedem a transformação de células B primárias e são altamente tóxicos para linhagens de células linfoblastóides infectadas por EBV. (SUN et al, 2009). Proteínas de choque térmico (Hsps) são uma classe de chaperonas moleculares que facilitam o dobramento e estabilidade adequada de proteínas, inibidores Hsp90 se ligam ao sítio de ativação ATP inibindo a atividade de chaperonização resultando em dobramento incorreto e degradação subsequente de proteínas celulares alvo. (NECKERS, L. & NECKERS, K. 2005).

Os compostos SC7, 11 e 19 possuem capacidade de reduzir o número de cópias e a transcrição por inibição seletiva do EBV, em análise de *docking* molecular por simulação, os sítios de proteína EBNA1 eram previstos para alinhar bem com SC7, 11 e 19, guiando novas informações para seletividade e desenvolvimento de futuros inibidores EBNA1. (JIANG et al, 2018).

Um tipo de célula promissora para estudos em vacinas são as células dendríticas (CD), essas sentinelas tem uma capacidade estimuladora excepcional de células T, que inclui capacidade de processar antígenos de forma eficiente e apresentá-los em moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MCPH) I e II em combinação com moléculas coestimuladoras de células T. (GURER et al, 2008). Uma abordagem recente que contorna a análise de CD *ex vivo* é direcionar antígenos para CD *in vivo*, incorporando antígenos microbianos ou tumorais em anticorpos contra receptores endocíticos de CD e inocular com formulações adjuvantes adequadas. Um receptor alvo é o DEC-205, uma proteína multilectina transmembrana endocítica tipo I expressa em CDs que distribui antígenos para endossomos tardios ou lisossomas, o que leva a degradação e apresentação de antígenos a MCPH II. (MAHNKE et al, 2000 & TRUMPFHELLER et al, 2006).

EBNA1 tem dupla contribuição para o processo oncogênico, primeiro sendo um elemento chave na manutenção episomal, possibilitando a expressão sustentável de produtos oncogênicos virais em células latentes, e segundo, contribui diretamente devido sua interferência em diversos processos da célula como transcrição gênica, *turn-over* de proteínas, vias de sinalização e apoptose. Diante do exposto, a pesquisa se justifica pela necessidade de mais estudos elucidativos direcionados a possíveis alvos moleculares para inibidores de EBNA1. (WILSON et al, 2018).

Os objetivos deste estudo são avaliar quais biomoléculas possuem potencial terapêutico sobre a oncogênese de EBV, elucidar quais vias celulares podem ser alvos de terapias, analisar candidatos seletivos como inibidores de EBNA1 e verificar a viabilidade

dessas terapias para modulação da resposta sobre a oncogenicidade de EBNA1 por meio de revisão bibliográfica.

2 METODOLOGIA

Esta pesquisa é uma revisão sistemática descritiva, onde os termos considerados foram padronizados de acordo com os descritores em ciências da saúde (DeCS), os artigos pesquisados obedeceram o ano de 1998 até 2020, através da base de dados NCBI e lista de referência dos artigos selecionados, sendo incluídos artigos em inglês e português. 69 artigos foram incluídos no estudo, 14 na introdução, 28 no referencial teórico e 27 nos resultados e discussão.

Para essa revisão os termos considerados foram: Antígenos nucleares EBV, Carcinoma nasofaríngeo, EBNA1, Inibidores de EBNA1. Os critérios de elegibilidade dos artigos se basearam em 4 aspectos clínicos: ação farmacológica de drogas anti-EBV, inibidores da proteína EBNA1, interatoma celular e Células dendríticas direcionadas a terapias adjuvantes para estudos modelos em vacinas anticâncer.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 ROSCOVITINA

A ativação de CDKs indica ser a etapa regulatória mais importante na progressão do ciclo celular, as CDKs formam complexos e iniciam uma cascata de eventos de sinalização *downstream*, levando a célula a sintetizar DNA, iniciar a mitose, e completar o ciclo celular. A Roscovitina é um desses inibidores de CDKs, ela compete pelo sítio de ligação de ATP das CDKs e inibe principalmente CDK2, junto com CDK1, 5, 7 e 9. (GARY et al, 2016). Este medicamento conhecido como CYC202 e Seliciclib, apresentou novas evidências de que possui alvos adicionais no desenvolvimento do tumor, como inibir a atividade do canal de K (potássio) do gene relacionado ao éter e o bloqueio do canal HERG reduzindo o crescimento de certos tipos de câncer. (GANAPATHI et al, 2009 & PARDO et al, 2005).

3.2 POLIAMIDAS

As poliamidas pirrol-imidazol desenvolvidas a partir de antibióticos de ligação distamicina ao DNA, são pequenas substâncias químicas sintéticas compostas dos aminoácidos aromáticos N-metilpirrol (Py) e N-metilimidazol (Im). (DERVAN & EDELSON, 2003). Experimentos demonstraram que as poliamidas Py-Im podem

antagonizar a ligação de fatores de transcrição ao DNA em células vivas, dentre esses fatores estão o receptor de andrógeno (RA), o fator 1 alfa induzível por hipóxia (HIF-1 α), o receptor de glicocorticóide (GR) e o fator nuclear Kappa (NF-kB). (RASKATOV et al, 2012a).

A expressão gênica hipóxica contribui para a patogênese de muitas doenças, HIF-1, um fator de transcrição central para a expressão do gene hipóxico, medeia vários processos, incluindo neovascularização, metástase e sobrevivência celular. Foi demonstrado que a poliamida 1 Py-Im inibe a expressão gênica mediada por HIF-1 em cultura de células, em tumores subcutâneos e tecidos normais reduz a expressão de fatores pró-angiogênicos e pró-metastáticos, inibindo a formação de novos vasos sanguíneos tumorais e suprimindo o crescimento tumoral. (SZABLOWSKI et al, 2016).

A regulação aberrante da expressão gênica pode resultar em um estado patológico, a capacidade de alterar perfis transcricionais com poliamidas pode possuir valor no desenvolvimento de estratégias terapêuticas, essas moléculas antivirais levam a degradação do genoma do vírus nas células oncogênicas evitando a citotoxicidade aguda, localizadas no elemento de simetria da díade oriP com inibição seletiva a ligação de EBNA1-oriP. (RASKATOV et al, 2012b).

3.3 INIBIDORES DE HSP90

Hsp90 é responsável pela maturação de proteínas de sinalização chave, incluindo quinases regulatórias, receptores de hormônios esteróides e fatores de transcrição. Hsp90 foi implicada na montagem e desmontagem de complexos de proteínas e pode suprimir a variação fenotípica. (RUTHERFORD & LINDQUIST 1998; WILLIAMS & FARES, 2010). Coletivamente Hsp90 α e Hsp90 β interagem com aproximadamente 10% do proteoma eucariótico, representando aproximadamente 2.000 proteínas, das quais, cerca de 725 interações foram determinadas e confirmadas por experimentos de interação proteína-proteína direta. (ZHAO et al, 2005 & ECHEVERRÍA et al, 2011).

A gelanamicina e seus análogos menos tóxicos se ligam ao sítio ATP de Hsp90 e inibem sua atividade como uma chaperona de proteína, resultando em dobramento incorreto ou degradação de proteínas clientes, esses inibidores suprimem a expressão de EBNA1 tanto em células B quanto epiteliais. (SUN & KENNEY, 2010). Uma fração de Hsp90 é encontrada na superfície das células cancerosas, bem como no meio extracelular, as proteínas clientes de Hsp90 regulam vasta gama de funções celulares, no entanto, muitas proteínas clientes são frequentemente mutadas ou superexpressas em células

neoplásicas, sendo alvos de pesquisas terapêuticas individuais para o tratamento de neoplasias. (GARG; KANDELWAL & BLAGG, 2016).

3.4 COMPOSTOS SC7, 11 E 19

Li et al (2010) identificou por triagem virtual da estrutura cristal de EBNA1 que SC7, 11 e 19 possuem capacidade de inibição de EBNA1 em dois ensaios baseados em células. Os compostos testados usaram um ensaio baseado em luciferase em células HEK293T transfectadas, o plasmídeo repórter de luciferase consistia em uma região de aproximadamente 2kb de EBV contendo OriP e Cp fundidos ao gene da luciferase. A incubação de células transfectadas com 5µM de SC7, 11 e 19, bloqueou completamente a ativação da transcrição de EBNA1.

Estudos anteriores avaliaram os efeitos de hidroxiureia (HU), SC7, 11 e 19 no número de cópias de EBV em células Raji. As células foram tratadas com 10µM de SC7, 11 e 19 ou 100µM de HU durante 6 dias, descobrindo-se que o tratamento com HU causou 50% de redução no número de cópias do genoma do EBV; o tratamento com SC11 e 19 causou uma redução de 75-90% no número de cópias, enquanto que SC7 não apresentou efeito aparente. (Ibidem, pag. 3).

3.5 ANTÍGENOS DIRECIONADOS PARA CDS EX VIVO E IN VIVO

As CDs podem ser encontradas em praticamente todos os tecidos, onde detectam desequilíbrios homeostáticos e processam antígenos para apresentação as células T, estabelecendo uma ligação entre as respostas imunes inatas e adaptativas. As CDs, secretam citocinas e fatores de crescimento modificando as respostas imunes em andamento e são influenciadas por suas interações com outras células imunes como *natural killer* e células linfóides inatas. (O'KEEFFE et al, 2015 & HERMANS et al, 2003)

A macroautofagia é um processo catalítico e uma via conservada encontrada em quase todas as espécies eucarióticas que transportam substratos citoplasmáticos para a degradação lisossomal. (DIKIC & ELAZAR, 2018). Além de sua função de homeostase, esse processo autofágico é usado por células apresentadoras de antígenos para apresentar material intracelular, endocítico ou fagocítico a MCPH II para células CD4+. (MUNZ, 2016).

A observação de tais funções sugeriram um possível tratamento imunológico para neoplasias como as ocasionadas por EBV, a abordagem consiste em apresentar qualquer antígeno para ser eliminado pelas CDs como uma vacina, o que permite apresentação

cruzada e desenvolvimento de uma resposta imune específica. Além da aplicação de uma vacina anticâncer, foi proposto que os inibidores dos pontos de controle imunológico poderiam ser utilizados para inibir sinais de tolerância imunológica emanados das CDs e mimetizar células tumorais. (PALUCKA & BANCHEREAU, 2016). Diferentes combinações, consistindo em componentes que envolvem respostas imunes inatas e adaptativas tem sido testadas, essas combinações incluem inibidor do *checkpoint* imune escolhido ou adjuvante, citocinas e anticorpos específicos para o tumor. (ZHU et al, 2015).

As limitações de tratamento imunológico único seriam contornadas pela combinação de diferentes agentes imunomoduladores, o uso de vacinas com inibidores *checkpoint*, aumentaria a resposta clínica, permitindo que cada uma cubra as deficiências da outra. Ensaios clínicos com objetivo de investigar a eficácia e segurança da abordagem combinatória, incluindo a aplicação de vacinas anticâncer e inibidores *checkpoint*, já estão sendo realizados. (SPROOTEN et al, 2019).

Estratégias *ex vivo* exploram o carregamento direto de antígenos em CDs autólogas derivadas com estimulação de CDs eficientes por meio de um coquetel de maturação, que normalmente consiste em uma combinação de citocinas pró-inflamatórias e agonistas do receptor *Toll-like*. Além de direcionar os receptores de CD, a abordagem *ex vivo* fornece a possibilidade de aplicar amplo espectro de métodos de carregamento de antígenos mais eficientes que não podem ser aplicados *in vivo*. (GARG et al, 2017; O'NEILL & BHARDWAJ, 2005).

Métodos *in vivo* de apresentação de antígenos cancerígenos as CDs são baseados no emprego de moléculas de superfície de CDs e sua maquinaria de receptor. Esta abordagem implica a utilização de ligantes de receptor de CDs, adjuvantes, anticorpos anti-receptor e outras substâncias que podem se ligar com precisão ao seu alvo em CDs. Dentre todas as moléculas de superfície de CDs, vários grupos delas podem ser destacadas como responsáveis pelo reconhecimento de moléculas estranhas ou pela absorção de antígenos. As CDs reconhecem diferentes sinais associados a processos patológicos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs). Para este propósito, existem diferentes sensores ambientais, receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) na superfície de diferentes subconjuntos de células dendríticas, como TLRs, receptores semelhantes a NOD, receptores de lectina tipo C (CLRs), RIG-I, MDA-5 e outros. (SANTOS & BUTTERFIELD, 2018; CERBONI et al, 2013).

Essas moléculas desencadeiam a maturação de CDs e a secreção de citocinas pró-inflamatórias se ligadas a PAMP ou DAMP, como lipopolissacarídeos microbianos, endotoxinas e proteínas de células hospedeira danificadas ou estressadas, incluindo células cancerosas. Consequentemente, essa sensibilidade de sinal emitido pelas CDs poderiam ser utilizados para aumentar a resposta imune regulada por CDs. Para esse processo os ligantes PRRs das CDs podem servir como adjuvantes na composição de vacinas anticâncer de CDs. (GALLUCI & MATZINGER, 2001; COFFMAN et al, 2010).

A apresentação de antígenos associados a tumores usando anticorpos monoclonais específicos de receptor mAb na presença de ativadores de CDs, elicia respostas imunes robustas em modelos pré-clínicos. CDX-1401 é uma vacina composta por um mAb humano específico para DEC-205 fundido ao antígeno tumoral NY-ESO-1. DEC-205 é extensivamente estudada por sua função no processamento e apresentação de antígenos, em combinação com agonistas de TLRs, podem ser uma plataforma eficaz para testar a indução de imunidade contra patógenos, bem como cânceres. (DHODAPKAR et al, 2014).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os efeitos da Roscovitina foram avaliados em uma ampla variedade de células cancerígenas, onde notou-se parada do ciclo celular e início da apoptose. A Roscovitina interrompe o ciclo celular em todas as linhagens de células cancerosas com o valor IC₅₀ médio de cerca de 15µM. (RAYNAUD et al, 2005). A interrupção de G₀, G₁, S ou G₂/M ocasionada por esse fármaco atua direto nas CDKs, além disso existem muitas vias moleculares que dependem da atividade CDKs como Ras-MAPK, NF-κB, p53, receptor de estrogênio, JAK-STAT e portanto são inibidos. (WHITTAKER et al, 2004; DEY et al, 2007; PAPRSKAROVA et al, 2009; WESIERSKA-GADEK et al, 2011; MOHAPATRA et al, 2003).

Esse inibidor demonstrou ter efeito sinérgico com outros agentes anticâncer, como dextrorubicina, taxol, 5-fluorouracil, vimblastina, radiação, irinotecano, etoposido e tamoxifeno. A roscovitina poderia ser utilizada em combinação com outros agentes em linfomas de células B explorando mecanismos adicionais para bloqueio de células infectadas e inativação de EBNA1. (CICENAS et al, 20015).

Kang & Dervan (2015) analisaram cinco poliamidas Py-Im que codificam para diferentes sequências de DNA em um modelo de linfoma de células B, e descobriram que a poliamida 1 desencadeia a liberação dos padrões moleculares associados ao dano

calreticulina, ATP e HMGB1. Consistente com essa análise, observaram aumento na fagocitose por macrófagos quando as células cancerosas foram expostas a poliamida 1. Este estudo revela um meio químico para desencadear uma morte celular necrótica inflamatória em células cancerosas.

Dickinson et al (1998) comprovou em um estudo experimental, que a atividade de ligação ao DNA do fator de transcrição específico do gene 5S RNA TFIIA foi suprimida por uma poliamida, como resultado a transcrição dos genes 5S do RNA pela RNA polimerase III foi coibida *in vitro* e em cultura de células de *Xenopus*. O uso da modulação alostérica para desviar conjuntos de proteínas altamente dinâmicos em direção a estados conformacionais que favorecem a ligação ao DNA fornece um mecanismo regulador poderoso para modular a ativação e repressão do gene. (CHENOWETH & DERVAN, 2010).

Sun et al (2013) demonstrou em seu estudo experimental que a droga inibidora de Hsp90, 17-DMAG, diminui a expressão de células imortais transfectadas. O 17-DMAG, também diminui a expressão da proteína quinase do vírus EBV endógena, e inibe a fosforilação de várias proteínas alvos de EBV conhecidas. A inibição de Hsp90 com 17-DMAG, 17-AAG ou geldanamicina reduz a expressão de EBNA1 em células B transformadas por EBV e células de linfoma de Burkitt *in vitro*. Outro inibidor de Hsp90, o BIIBO21 suprimiu a expressão de EBNA1 e LMP1 em células T e NK positivas para EBV, reduzindo o crescimento de células NK infectadas com EBV em camundongos NOG. (SUZUKI et al, 2015).

A gelanamicina também neutraliza células NK-T de linfoma para EBV, e o inibidor AT13387 reduz a formação de tumor em camundongos injetados com células de CN. Os inibidores de Hsp90 possuem modulação inibitória em outras proteínas virais e celulares infectadas por vírus. 17-DMAG reduziu a expressão de várias proteínas quinases de herpesvírus, incluindo BGLF4, citomegalovírus UL97 e proteína quinase de herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV). (SHATZER et al, 2017).

Os compostos SC7, 11 e 19 já demonstraram inibir a ligação EBNA1/DNA *ex vivo*, e em outro estudo de triagem de alto rendimento foram identificados mais três compostos LB2,3 e 7. LB7 apresentou inibição seletiva de EBNA1/DNA, conforme refletida por seu valor IC50 e sua atividade inibitória foi mais potente do que a de SC7. LB7 era o único novo composto capaz de reduzir o número de cópias EBV. Essas descobertas sugerem que esses compostos podem ser eficazes na depleção de genomas de EBV em células infectadas. (JIANG et al, op. cit., p. 7).

A vacinação com CDs deve ser alvo contra patógenos microbianos, mas também ameaças autólogas, como células tumorais. Com estratégias de vacina se mostrando altamente eficazes, a vacinação com CDs encontrou um ponto de apoio firme no câncer nos últimos 20 anos. A observação de que o sistema imune pode reconhecer e eliminar células malignas aumentou um crescimento exponencial da pesquisa de imunologia tumoral e no estudo clínico da imunoterapia contra o câncer, incluindo a vacinação com CDs. (ANGUILLE et al, 2014).

O uso de RNA que codifica o antígeno de comprimento total em comparação com os peptídeos para carrear CDs de vacinas com doenças associadas a antígenos (DAAs) não requer nenhuma definição de epítipo anterior, tornando-o amplamente aplicável em todos os genótipos HLA e potencialmente permitindo a apresentação de MCPH I/II, dependendo da segmentação intracelular. (WILLEMEN et al, 2020).

O desenvolvimento de tecnologias sobre a expressão de outros genes relacionados ao tumor e talvez oncogênicos levaram a uma mudança em direção ao uso de RNAs sintéticos definidos. mRNAs que codificam outros genes e RNAs de interferência (si), *short hairpin* (sh) RNA ou microRNAs (miRs), estão cada vez mais ganhando atenção tanto na pesquisa pré-clínica quanto na clínica como formas de manipular o perfil de expressão gênica de CDs para otimizar a eficácia da vacina. (Ibidem, pag. 2).

Estudos *in vitro* em humanos demonstraram que CDs com IL-12, IL-15 + IL-15R α ou IFN α mRNA, além do RNA codificante de tumor associado a antígeno, aumenta a ativação de células NK e T antitumorais e funções efetoras. A introdução de moléculas codificando mRNA CD40L, CD137L e CD134L em CDs, mostrou aumentar as respostas das células TCD4⁺ e CD8⁺ *in vitro* e a imunidade anti-tumoral *in vivo*. (BONTKES et al, 2006; BONTKES et al, 2008; Van den Bergh et al, 2015; WILLEMEN et al, 2015).

Em seu estado imaturo, as CDs patrulham o microambiente do tecido, sua apresentação ocorre por meio de TLRs levando a migração para os linfonodos de drenagem e a apresentação de epítopos processados para linfócitos T. Durante a ativação dos linfócitos T, as CDs envolvem os TCRs de células T, secretam citocinas específicas e estimulam as respostas imunes em direção Th1, Th2 ou Tregs, dependendo do ambiente de citocinas. (MASTELIC-GAVILLET et al, 2019).

No estado estacionário, isto é, na ausência de agentes infecciosos ou estímulos deliberados de maturação de CDs, as CDs exibem um fenótipo imaturo. A ligação de mAbs anti-DEC-205 sozinho é insuficiente para promover a maturação e ativação de DEC-205 + CDs. No entanto, a entrega de antígeno direcionado a anti-DEC-205, em

conjunto com a coadministração de estímulos de maturação de CDs, como mAbs anti-CD40 agonísticos, poly (I:C), citosina-fosfato-guanina (CpG), lipopolissacarídeo ou agonistas de TLRs 7/8, resulta em capacidade de apresentação de antígeno e expressão aumentada de moléculas coestimulatórias de células T maturando DEC-205 e CDs. (HAWIGER et al, 2001; KRETSCHMER et al, 2005; SOARES et al, 2007; WANG et al, 2012).

Estes avanços representam um meio de eliciar a imunidade robusta específica para antígenos caracterizada por altas frequências de células CD4⁺ produtoras de IL-2, IFN- γ , CD8⁺, produção de IgG de alta afinidade e memória celular. A combinação de direcionamento de DEC-205, CDs e maturação deliberada de CDs demonstrou responsividade produtiva contra patógenos, incluindo vírus, bactérias, parasitas e também contra antígenos de tumor. (PETZOLD et al, 2013).

A experiência clínica com a vacinação baseada em CDs ressalta algumas vantagens distintas. Primeiro, a imunoterapia com CDs é segura; reação no local da injeção, febre e fadiga são os efeitos adversos mais comuns relatados nos estudos de fase I, a citotoxicidade de fase 3-4 é rara. As preocupações com autoimunidade induzida por imunoterapia parecem menos preocupantes para abordagens baseadas em CDs em comparação com terapias com mAbs ou citocinas. (SHARMA et al, 2011; LEONHARTSBERGER et al, 2012).

5 CONCLUSÃO

A Roscovitina demonstrou exibir efeitos citotóxicos para várias linhagens de células cancerosas humanas, além de induzir parada do ciclo celular em G1, G2 e M. Estudos anteriores analisaram também a indução de apoptose de células oncogênicas. Poliamidas são alvos atraentes para supressão de células cancerosas tendo o DNA como ligante alostérico modulando a atividade de receptor para genes alvo, com base na sequência de DNA.

Os inibidores de Hsp90 podem reprimir a expressão ou localização nuclear de outras proteínas EBV, necessárias a replicação de DNA lítico EBV. A triagem virtual de alto rendimento é uma estratégia promissora para estudos experimentais de moléculas direcionadas como os compostos SC7, 11 e 19 com excelente inibição seletiva de EBNA1-DNA sugerindo um mecanismo eficaz na depleção de genomas EBV.

Métodos *ex vivo* e *in vivo* de CDs com terapias adjuvantes apresentam alta eficiência na taxa de resposta sobre a oncogenicidade, o desenvolvimento de vacinas anti-

câncer por meio de CDs é uma alternativa viável junto ao checkpoint imunológico para bloquear a oncogênese. DEC-205 possui funções na apresentação e processamento de antígenos e em combinação com agonistas TLRs e a administração de estímulos em CDs como os mAbs, possuem potencial imunogênico contra antígenos como EBNA1. Espera-se que as terapias com CDs preservem adequadamente a qualidade de vida em pacientes imunizados.

REFERÊNCIAS

- ANGUILLE, S.; SMITS, E. L.; LION, E. et al. Clinical use dendritic cells for cancer therapy. *The Lancet Oncology*. 2014; 15:e257-67. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70585-0.
- BONTKES, H. J.; KRAMER, D.; RUIZENDAAL, J. J. et al. Dendritic cells transfected with interleukin-12 and tumor-associated antigen messenger RNA induce high avidity cytotoxic T cells. *Gene Therapy*. 2006; 14:366-375. doi: 10.1038/sj.gt.3302874.
- BONTKES, H. J.; KRAMER, D.; RUIZENDAAL, J. J. et al. Tumor associated antigen and interleukin-12 mRNA transfected dendritic cells enhance effector function of natural killer cells and antigen specific T-cells. *Clinical Immunology*. 2008; 127:375-384. doi: 10.1016/j.clim.2008.02.001.
- CERBONI, S.; GENTILI, M.; MANEL, N. Diversity of pathogen sensors in dendritic cells. *Adv Immunol*. 2013; 120:211-237. doi: 10.1016/B978-0-12-417028-5.00008-9.
- CHENOWETH, D. M.; DERVAN, P. B. Structural Basis for Cyclic Py-Im Polyamide Allosteric Inhibition of Nuclear Receptor Binding. *Journal of the American Chemical Society*. 2010; 132(41):14521-14529. doi: 10.1021/ja105068b.
- CICENAS, J.; KALYAN, K.; SOROKINAS, A. et al. Roscovitine in Cancer and Other diseases. *Annals of Translational Medicine*. 2015; 3(10):1-12. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.03.61.
- COFFMAN, R. L.; SHER, A.; SEDER, R. A. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity*. 2010; 33:492-503. doi: 10.1016/j.immuni.2010.10.002.
- DERVAN, P. B.; EDELSON, B. S. Recognition of the DNA minor groove by pyrrole-imidazole polyamides. *Elsevier*. 2003; 13(3):284-299. doi: 10.1016/S0959-440X(03)00081-2.
- DEY, A.; WONG, E. T.; CHEOK, C. F. et al. R-Roscovitine simultaneously targets both the p53 and NF-kB pathways and causes potentiation of apoptosis: implications in cancer therapy. *Cell Death and Differentiation*. 2007; 15:263-273. doi: 10.1038/sj.cdd.4402257.
- DHODAPKAR, M. V.; SZNOL, M.; ZHAO, M. et al. Induction of Antigen-Specific Immunity with Vaccine Targeting NY-ESO-1 to the Dendritic Cell Receptor DEC-205. *Clinical Trial*. 2014; 6(232):1-22. doi: 10.1126/scitranslmed.3008068.
- DICKINSON, L. A.; GULIZIA, R. J.; TRAUGER, J. W. et al. Inhibition of RNA polymerase transcription in human cells by synthetic DNA-binding ligands. *PNAS*. 1998; 95(22):12890-12895. doi: 10.1073/pnas.95.22.12890.
- DIKIC, I.; ELAZAR, Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2018; 19(6):349-364. doi: 10.1038/s41580-018-0003-4.

DUELLMAN, S. J.; THOMPSON, K. L.; COON, J. J. et al. Phosphorylation sites of Epstein-Barr virus EBNA1 regulate its function. *J Gen Virol.* 2009; 90:2251-2259. doi: 10.1099/vir.0.012260-0.

ECHEVERRÍA, P. C.; BERNTHALER, A.; DUPUIS, P. et al. An Interaction Network Predicted from Public Data as a Discovery Tool: Application to the Hsp90 Molecular Chaperone Machine. *Plos One.* 2011; 6(10):e26044. doi: 10.1371/journal.pone.0026044.

EL-SHARKAWY, A.; ZAIDAN, L. A.; MALKI, A. Epstein-Barr Virus-Associated Malignancies: Roles of Viral Oncoproteins in Carcinogenesis. *Frontiers in Oncology.* 2018; 8(265):1-13. doi: 10.3389/fonc.2018.00265.

GALLUCI, S.; MATZINGER, P. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol.* 2001; 13(1):114-119. doi: 10.1016/s0952-7915(00)00191-6.

GANAPATHI, S. B.; KESTER, M.; ELMSLIE, K. S. State-dependent block of HERG potassium channels by R-roscovitine: implications for cancer therapy. *American Journal of Physiology Cell Physiology.* 2009; 296(4):C701-C710. doi: 10.1152/ajpcell.00633.2008.

GARG, A. D.; PEREZ, M. V.; SCHAAF, M. et al. Tria watch: Dendritic cell-based anticancer immunotherapy. *Oncoimmunology.* 2017; 6(7):e1328341. doi: 10.1080/2162402X.2017.1328341.

GARG, G.; KHANDELWAL, A.; BLAGG, B. S. J. Anticancer Inhibitors of Hsp90 Function: Beyond the Usual Suspects. *Adv Cancer Res.* 2016; 129:51-88. doi: 10.1016/bs.acr.2015.12.001.

GARY, C.; HAJEK, M.; BIKTASOVA, A. et al. Selective antitumor activity of roscovitine in head and neck cancer. *Oncotarget.* 2016; 7(25):38598-38611. doi: 10.18632/oncotarget.9560.

GIANTI, E.; MESSICK, T. E.; LIEBERMAN, P. M.; ZAUHAR, R. Computational analysis of EBNA1 “druggability” suggests novel insights for Epstein-Barr virus inhibitor design. *J Comput Aided Mol Des.* 2016; 30(4):285-303. doi: 10.1007/s10822-016-9899-y.

GURER, C.; STROWIG, T.; BRILOT, F. et al. Targeting the nuclear antigen 1 of Epstein-Barr virus to the human endocytic receptor DEC-205 stimulates protective T-cell responses. *Blood.* 2008; 112(4):1231-1239. doi: 10.1182/blood-2008-03-148072.

HAU, M. P.; LUNG, H. L.; WU, M. et al. Targeting Epstein-Barr Virus in Nasopharyngeal Carcinoma. *Frontiers in Oncology.* 2020; 10(600):1-18. doi: 10.3389/fonc.2020.00600.

HAWIGER, D.; INABA, K.; DORSETT, Y. et al. Dendritic Cells Induce Peripheral T Cell Unresponsiveness Under Steady State Conditions In Vivo. *J. Exp. Med.* 2001; 194(6):769-780. doi: 10.1084/jem.194.6.769.

HERMANS, I. F.; SILK, J. D.; GILEADI, U. et al. NK Cells Enhance CD4⁺ and CD8⁺ Response To Soluble Antigen In Vivo through Direct Interaction with Dendritic Cells.

The Journal of Immunology. 2003; 171(10):5140-5147. doi: 10.40409/jimmunol.171.10.5140.

JIANG, L.; XIE, C.; LUNG, H. L. et al. EBNA1-targeted inhibitors: Novel approaches for the treatment of Epstein-Barr virus-associated cancers. *Theranostics*. 2018; 8(19):5307-5319. doi: 10.7150/thno.26823.

KANG, J. S.; DERVAN, P. B. A sequence-specific binding small molecule triggers the release of immunogenic signals and phagocytosis in a model of B-cell lymphoma. *Q Rev Biophys*. 2015; 48(4):1-20. doi: 10.1017/S0033583515000104.

KRETSCHMER, K.; APOSTOLOU, I.; HAWIGER, D. et al. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nature Immunology*. 2005; 6(12):1219-1227. doi: 10.1038/ni1265.

LEONHARTSBERGER, N.; RAMONER, R.; FALKENSAMMER, C. et al. Quality of life during dendritic cell vaccination against metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2012; 61:1407-1413. doi: 10.1007/s00262-012-1207-7.

LI, N.; THOMPSON, S.; SCHULTZ, D. C. et al. Discovery of Selective Inhibitors Against EBNA1 via High Throughput *In Silico* Virtual Screening. *Plos One*. 2010; 5(4):e10126. doi: 10.1371/journal.pone.0010126.

MAHNKE, K.; GUO, M.; LEE, S. et al. The Dendritic Cell Receptor for Endocytosis, DEC-205, Can Recycle and Enhance Antigen Presentation via Major Histocompatibility Complex Class II-Positive Lysosomal Compartments. *The Journal of Cell Biology*. 2000; 151(3):673-684. doi: 10.1083/jcb.151.3.673.

MASTELIC-GAVILLET, B.; BALINT, K.; BOUDOUSQUIE, C. et al. Personalized Dendritic Cell Vaccines - Recent Breakthroughs and Encouraging Clinical Results. *Frontiers in Immunology*. 2019; 10(766):1-10. doi: 10.3389/fimmu.2019.00766.

MOHAPATRA, S.; CHU, B.; WEI, S. et al. Roscovitine Inhibits STAT5 Activity and Induces Apoptosis in the Human Leukemia Virus Type 1-Transformed Cell Line MT-2. *Cancer Research*. 2003; 63:8523-8530. PMID: 14679020.

MORALES-SÁNCHEZ, A.; FUENTES-PANANÁ, E. M. Human Viruses and Cancer. *Viruses*. 2014; 6:4047-4079. doi: 10.3390/v6104047.

MUI, U. N.; HALEY, C. T.; TYRING, S. K. Viral Oncology: Molecular Biology and Pathogenesis. 2017; 6(111):1-58. doi: 10.3390/jcm6120111.

MUNZ, C. Autophagy Beyond Intracellular MHC Class II Antigen Presentation. *Trends in Immunology*. 2016; 37(11):755-763. doi: 10.1016/j.it.2016.08.017.

NECKRES, L.; NECKERES, K. Heat-shock protein 90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. *Expert Opinion On Emerging Drugs*. 2002; 7(2):277-288. doi: 10.1517/14728214.7.2.277.

O'KEEFFE, M.; MOK, W. H.; RADFORD, K. J. Human dendritic cell subsets and function in health and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2015; 71(22):4309-4325. doi: 10.1007/s00018-015-2005-0.

O'NEILL, D.; BHARDWAJ, N. Generation of Autologous Peptide- and Protein- Pulsed Dendritic Cell for Patient-Specific Immunotherapy. *Methods in Molecular Medicine*. 2005; 109:97-112. doi: 10.1385/1-59259-862-5:097.

PALUCKA, K.; BANCHEREAU, J. Diversity and collaboration for effective immunotherapy. *Nature Medicine*. 2016; 22(12):1390-1391. doi: 10.1038/nm.4249.

PAPRSKAROVA, M.; KRYSTOF, V.; JORDA, R. et al. Functional p53 in Cells Contributes to the Anticancer Effect of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Roscovitine. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2009; 107:428-437. doi: 10.1002/jcb.22139.

PARDO, L. A.; CONTRERAS-JURADO, C.; ZIENTKOWSKA, M. et al. Role of Voltage-gated Potassium Channels in Cancer. *The Journal of Membrane Biology*. 2005; 205(3):115-124. doi: 10.1007/s00232-005-0776-1.

PETZOLD, C.; SCHALLENBERG, S.; STERN, J. N. H. et al. Target Antigen Delivery to DEC-205+ Dendritic Cells for Tolerogenic Vaccination. *The Review of Diabetic Studies*. 2012; 9(4):305-318. doi: 10.1900/RDS.2012.9.305.

RASKATOV, J. A.; HARGROVE, A. E.; SO, A. Y. et al. Pharmacokinetics of Py-Im Polyamides Depend on Architecture: Cyclic versus Linear. *J Am Chem Soc*. 2012b; 134(18):7995-7999. doi: 10.1021/ja302588v.

RASKATOV, J. A.; NICKOLS, N. G.; HARGROVE, A. E. et al. Gene expression changes in a tumor xenograft by a pyrrole-imidazole polyamide. *PNAS*. 2012a; 109(40):16041-16045. doi: 10.1073/pnas.1214267109.

RAYNAUD, F. I.; WHITTAKER, S. R.; FISCHER, P. M. et al. *In vitro* and *In vivo* Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relationships for the Trisubstituted Aminopurine Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors Olomoucine, Bohemine and CYC202. *Cancer Therapy: Preclinical*. 2005; 11(13):4875-4887. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2264.

RUTHERFORD, S. L.; LINDQUIST, S. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature*. 1998; 396(6709):336-342. doi: 10.1038/24550.

SANTOS, P. M.; BUTTERFIELD, L. H. Dendritic Cell-Based Cancer Vaccines. *J Immunol*. 2018; 200(2):1-18. doi: 10.4049/jimmunol1701024.

SHARMA, A.; KOLDOVSKY, U.; XU, S. et al. HER-2 Pulsed Dendritic Cell Vaccine Can Eliminate HER-2 Expression and Impact Ductal Carcinoma In Situ. *Cancer*. 2011; 1-9. doi: 10.1002/cncr.26734.

SHATZER, A.; ALI, M. A.; CHAVEZ, M. et al. Ganetespib, an HSP90 inhibitor, kills Epstein-Barr virus (EBV) infected B and T cells and reduces the percentage of EBV-infected cells in the blood. *Leuk Lymphoma*. 2017; 58(4):1-15. doi: 10.1080/10428194.2016.1213823.

SOARES, H.; WAECHTER, H.; GLAICHENHAUS, N. et al. A subset of dendritic cells induces CD4⁺ T cells to produce IFN- γ by an IL-12-independent but CD70-dependent

mechanism in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*. 2007; 204(5):1095-1106. doi: 10.1084/jem.20070176.

SPROOTEN, J.; CEUSTERS, J.; COOSEMANS, A. et al. Trial watch: dendritic cell vaccination for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*. 2019; 8(11):e1638212. doi: 10.1080/2162402X.2019.1638212.

SUN, X.; BARLOW, E. A.; MA, S. et al. Hsp90 inhibitors block outgrowth of EBV-infected malignant cell in vitro and in vivo through an EBNA1-dependent mechanism. *PNAS*. 2010; 107(7):3146-3151. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.0910717107>.

SUN, X.; BRISTOL, J. A.; IWAHORI, S. et al. Hsp90 Inhibitor 17-DMAG Decreases Expression of Conserved Herpesvirus Protein Kinases and Reduces Virus Production in Epstein-Barr Virus-Infected Cells. *Journal of Virology*. 2013; 87(18):10126-10138. doi: 10.1128/JVI.01671-13.

SUN, X.; KENNEY, S. Hsp90 Inhibitors: A potential treatment for latent EBV infection?. *Cell Cycle*. 2010; 9(9):1665-1666. doi: 10.4161/cc.9.911594.

SUZUKI, M.; TAKEDA, T.; NAKAGAWA, H. et al. The heat shock 90 inhibitor BIIB021 suppresses the growth of T and natural killer cell lymphomas. *Frontiers in Microbiology*. 2015; 6(280):1-10. doi: 10.3389/fmicb.2015.00280.

SZABLOWSKI, J. O.; RASKATOV, J. A.; DERVAN, P. B. An HRE-binding Py-Im polyamide impairs hypoxic signaling in tumors. *Mol Cancer Ther*. 2016; 15(4): 608-617. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-150719.

TRUMPFHELLER, C.; FINKE, J. S.; LÓPEZ, C. B. et al. Intensified and protective CD4⁺ T cell immunity in mice with anti-dendritic cell HIV gag fusion antibody vaccine. *Journal of Experimental Medicine*. 2006; 203(3):607-617. doi: 10.1084/jem.20052005.

Van den Bergh, J.; WILLEMEN, Y.; LION, E. et al. Transpresentation of interleukin-15 by IL-15/IL-15R α mRNA-engineered human dendritic cells boosts antitumoral natural killer cell activity. *Oncotarget*. 2015; 6(42):44123-44133. doi: 10.18632/oncotarget.6536.

WANG, B.; ZAIDI, N.; HE, L. et al. Targeting of the non-mutated tumor antigen HER2/neu to mature dendritic cells induces an integrated immune response that protects against breast cancer in mice. *Breast Cancer*. 2012; 1-17. doi: 10.1186/bcr3135.

WESIERSKA-GADEK, J.; GRITSCH, D.; ZULEHNER, N. et al. Roscovitine, a Selective CDK Inhibitor, Reduces the Basal and Estrogen-Induced Phosphorylation of ER- α in Human ER-Positive Breast Cancer Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2011; 112:761-772. doi: 10.1002/jcb.23004.

WHITTAKER, S. R.; WALTON, M. I.; GARRETT, M. D. et al. The Cyclin-dependent Kinase Inhibitor CYC202 (*R*-Roscovitine) Inhibits Retinoblastoma Protein Phosphorylation, Causes Loss of Cyclin D1, and Activates the Mitogen-activated Protein Kinase Pathway. *Cancer Research*. 2004; 64:262-272. doi: 10.1158/0008-5472.can-03-0110.

WILLEMEN, Y.; Van den Bergh, J. M. J.; LION, E. et al. Engineering monocyte-derived dendritic cells to secrete interferon- α enhances their ability to promote adaptive and innate anti-tumor immune effector functions. *Cancer Immunol Immunother.* 2015; 831-842. doi: 10.1007/s00262-015-1688-2.

WILLEMEN, Y.; VERSTEVEN, M.; PEETERS, M. et al. Ribonucleic Acid Engineering of Dendritic Cells for Therapeutic Vaccination: Ready 'N Able to Improve Clinical Outcome?. *Cancers.* 2020; 12:1-23. doi: 10.3390/cancers12020299.

WILLIAMS, T. A.; FARES, M. A. The Effect of Chaperonin Buffering on Protein Evolution. *Genome Biology and Evolution.* 2010; 2:609-619. doi: 10.1093/gbe/evq045.

WILSON, J. B.; MANET, E.; GRUFFAT, H. et al. EBNA1: Oncogenic Activity, Immune Evasion and Biochemical Functions Provide Targets for Novel Therapeutic Strategies against Epstein-Barr Virus-Associated Cancers. *Cancers.* 2018; 10(4):1-30. doi: 10.3390/cancers10040109.

YASUDA, A.; NOGUCHI, K.; MINOSHIMA, M. et al. DNA ligand designed to antagonize EBNA1 represses Epstein-Barr virus-induced immortalization. *Cancer Science.* 2011; 102(12):2221-2230. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02098.x.

ZHAO, R.; DAVEY, M.; HSU, YA-CHIEH. et al. Navigating the Chaperona Network: An Integrative Map of Physical and Genetic Interactions Mediated by the Hsp90 Chaperone. *Cell.* 2005; 120:715-727. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.024.

ZHU, E. F.; GAI, S. A.; OPEL, C. F. et al. Synergistic Innate and Adaptive Immune Response To Combination Immunotherapy with Anti-Tumor Antigen Antibodies and Extended Serum Half-Life IL-2. *Cancer Cell.* 2015; 27(4):489-501. doi: 10.1016/j.ccell.2015.03.004.