

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL
PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA Y SANIDAD ANIMAL**

**Transporte de adenovirus oncolítico canino
mediado por células tumorales para el
tratamiento de osteosarcoma canino**

**FRANCISCA ANDREA ALCAYAGA MIRANDA
OCTUBRE, 2009**

RAMÓN ALEMANY BONASTRE Y JOSEP PASTOR MILÁN, Investigador Titular del Instituto Catalán de Oncología y Profesor Titular del Área de conocimiento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona, respectivamente,

CERTIFICAN:

Que la memoria titulada '**Transporte de adenovirus oncolítico canino mediado por células tumorales para el tratamiento de osteosarcoma canino**', presentada por **FRANCISCA ANDREA ALCAYAGA MIRANDA** para la obtención del grado de **Doctor en Veterinaria**, ha sido realizada bajo nuestra dirección y, considerándola finalizada, autorizamos su presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Bellaterra, a 26 de Octubre de 2009.

Firmado: Ramón Alemany Bonastre

Firmado: Josep Pastor Milán

**Tesis Doctoral realizada a través de la Beca de Formación de
Personal Investigador UAB2006-00271**

A mi madre
A mis hermanos
A mi Mami Lucy

Después de 4 años de doctorado, después de convivir más de 1000 días con las personas del laboratorio, después de cientos de horas conversando con los ratones, después de pensar mil veces que dejaba el doctorado, después de tantas horas tratando de entender a los virus, después de tantas y tantas cosas... la tesis ha terminado. Y no puedo dejar de agradecer a todas las personas que han contribuido en el desarrollo de este proyecto, porque este trabajo ha sido fruto del esfuerzo de muchas personas. Primero que todo, quiero agradecer a mis Directores de tesis: Ramón y Josep.

Gracias **RAMÓN!** por acogerme en tu grupo y por darme la oportunidad de aprender de ti. He conocido a la ciencia gracias a ti! Gracias por todo lo que me has enseñado, por el apoyo que me has entregado cuando este trabajo se iba a la deriva, por todos los salvavidas que me has entregado en estos años. Gracias por no hacernos perder la esperanza, por alentarnos cuando los ánimos estaban bajos y por creer en lo que hacemos. Gracias por la confianza y libertad que nos entregas a diario. Gracias Ramón, por las muchas veces que me recordaste que 'lo cortés no quita lo valiente' y aunque todavía no me creas te prometo que ya lo he aprendido. En definitiva, gracias Ramón por dejarme conocerte como científico y como persona. Tienes mi más profunda admiración y agradecimiento, por siempre.

Gracias **Josep**, por las veces que me has ayudado, incluso cuando ni siquiera me conocías. La beca la he conseguido gracias a ti, eso no lo olvido! Gracias, porque sin esa ayuda no habría podido llegar hasta aquí.

También quiero agradecer sinceramente a una persona que ha sido fundamental para el desarrollo de esta tesis y, también, para mi formación profesional y personal. Gracias **MANEL**, por toda la ayuda que me has entregado. Sin ti no sé que hubiera sido de mí en el laboratorio! Gracias por todas las cosas que me has enseñado, por escucharme, por explicarme una y otra vez como hacer los protocolos, por tu paciencia, por tu dedicación a este trabajo y a la de todos los del grupo, por reforzarnos los ánimos, por ver la parte positiva de cada experimento (aunque haya sido desastroso!!) y por la dirección de este trabajo.

Pero este trabajo no se hubiera realizado sin la ayuda de la gente de mi grupo: **los RA/TG!** Gracias por todos los momentos que hemos compartido dentro y fuera del laboratorio! por todas las horas convividas, por todas las veces que me han ayudado en los experimentos, por todas las ideas que me han dado, por todos los cafés, las cervezas, las comidas, las cenas, las bravas y, como no, por las nunca

bien ponderadas reuniones de grupo. Gracias por no desilusionarse tanto cuando llegué yo al grupo y no la 'Paca de Brasil!'. Que puedo decirte **Juanjo** Todas las palabras de agradecimiento del mundo no alcanzarían para demostrarte lo tremendamente agradecida que estoy de ti. Gracias por todas las veces que me has socorrido en el estabulario, por pasarme las células, por crear la teoría del autobús, por hacerme reír siempre con tus canciones... no olvidaré jamás al chowchow! Gracias por tus abrazos, por tu sonrisa y por tu amistad. Por estar a mi lado cada día, por corregirme todo, todo, todo, todo, absolutamente todo lo que escribo. No puedo imaginar el laboratorio sin ti Juanji. Tu amistad es sin duda el mejor recuerdo que me llevo del laboratorio. Gracias **Marta**, porque siempre estuviste lista para ayudarme en los experimentos y para enseñarme a acortar un protocolo. Por tu dulzura y compañía, por tu mirada tan comprensiva y por cuidarme las veces que sentiste que fue necesario. Eres preciosa! Gracias **Cristina**, porque aunque no te lo puedas creer eres la motivación del grupo! eres LA PROMESA! gracias por siempre escucharme, aunque fuese a la 1 de la madrugada y, por la frescura y libertad de tus conversaciones. Eres una mujercita increíble! Gracias **Alenka**... juntas podíamos hacer del laboratorio una piscina de lágrimas!. No había conocido nunca mujer más empática que tú cuando de lágrimas se trataba. Gracias Ale por las infinitas cosas que me has enseñado en el laboratorio, por el amor y la vocación que entregas a lo que haces que sin duda más de una vez me motivaron. Estoy segura que llegarás muy lejos con la inmunoterapia! eres una crack! Gracias **Jordi**, por tranquilizarme y cuidarme en mis momentos de stress máximos. Por las veces que me has ayudado en el estabulario y por todas las veces que nos has hecho sonreír imitando a los Hámster. Suerte con Start Trek! Gracias **Miguel**, por la infinita comprensión, amor y preocupación que has tenido desde el primer día conmigo. Llegamos con un día de diferencia al laboratorio y desde el primer momento supe que eras un noble! Gracias **Raúl**, por tu tranquilidad, tus risas y por preocuparte de mi salud. Tienes una admirable vocación de biólogo aún siendo médico. Estoy segura que llegarás muy lejos. Gracias **Sonia**, por las muchas veces que me has enseñado a valorar esta tesis y por todos los momentos compartidos. Gracias **Edu**, por tu energía, por no desmotivarte y por seguir creyendo en el futuro posible nacimiento del ICOCAV, suerte!

También quiero agradecer a toda la gente del LRT1 y LRT2 por la ayuda que me han dado durante estos años con los ordenadores, con las PCR, con los electroporadores, con las centrífugas y con los microscopios. Por las miles de veces que me han prestado material y reactivos y, por todas las risas que me han entregado. Me han hecho muy feliz! Quiero agradecer principalmente a **Laia**, fuiste

la primera persona que me sonrió en el laboratorio y nunca más dejaste de hacerlo. Para mí son inolvidables las conversaciones a través de las poyatas y tu magnífica manera de andar siempre cronometrada. Ah! gracias por cronometrar también mis tiempos de tesis! Gracias por los muchos cafés y tés tomados, por compartir tu comida conmigo cuando creías que yo estaba comiendo menos, por las veces que cantaste en cultivos, por la música que me has regalado y por los conciertos que hemos compartido. Por el apoyo incondicional que me has dado, porque cada vez que lo he necesitado me abrazaste antes que yo te lo pidiera, porque me has parado más de cien veces el último par de meses, por todos tus consejos, tu cariño, tu compañía y tu preocupación. Gracias por cuidarme tanto, tanto, tanto, tanto... que de sólo pensarlo me dan ganas de llorar. Gracias por compartir conmigo la pasión por Jack ... te prometo que algún día haremos unas birras tres personas: tú, Jack y yo!. Gracias por corregir la ortografía y la gramática de esta tesis. Por todo esto tienes mi amor, respeto y amistad para toda la vida. Te quiero! Gracias **Ari**, por ayudarme con las PCR y por tu amistad tan linda. Desde que marchaste del laboratorio te he echado mucho de menos. Gracias **Laura**, por tener siempre la mejor disposición para ayudarme, por tu buen humor, por tu sinceridad y porque nunca te has negado a escucharme. Gracias **María** (Mery!) Por la cantidad de veces que me has ayudado con el Word, Excell, etc, el formato de esta tesis no sería lo que es si no lo hubieses arreglado tú. Gracias **Gris**, por tu sonrisa y por la fuerza que me has entregado en este tiempo. Gracias **Helena**, por compartir las mañanas en cultivos conmigo y sobretodo por todo lo que me has hecho reír. Gracias **David**, aunque consideras que el trabajo en veterinaria no es absolutamente necesario para que la ciencia avance, estoy segura que algún cambiarás de opinión. Gracias por todas las veces que me has ayudado y por las muchas conversaciones que hemos tenido. También quiero agradecer a las chicas de Angio! **Marta, Wilmar, María, Mar, Gabi, Mercè y Vane**, por prestarme reactivos y materiales, por las inmunohistoquímicas y tinciones de hematoxilina-eosina que han hecho junto conmigo y, sobretodo, por las infinitas sonrisas y conversaciones que me han regalado estos años. Gracias **Marc**, por recordarme que no debo interrumpir las conversaciones ajenas y gracias **Gemma** por tu sonrisa, por ser tan linda y por vivir el estrés de la tesis junto conmigo. Gracias a las chicas de las nuevas generaciones: **Mireia, Clara y Marta y, también a Sara**, por siempre tener la disposición de ayudarme cada vez que lo necesité. Gracias también a los que ya no están, **Pepe Mari y Álvaro**, por toda la buena onda que tuvieron conmigo cuando recién llegué al laboratorio. También quiero dar las gracias a una chica que, aunque no pertenece ni al LRT1 ni al LRT2, siempre me ha ayudado con una enorme sonrisa. Gracias **Itziar**, por ayudarme con la ultracentrífuga cuando me secuestró

el virus, por prestarme materiales y reactivos y por regalarme tu amistad. Mucha suerte en todo!

Gracias **Alberto**, por la preocupación que siempre has tenido por mí. Por creer en el proyecto de los 'perros', por enseñarme a operar ratones, por consolarme en mis momentos de tristeza, por aconsejarme profesional y personalmente. Lo alfajores más cuidados siempre fueron para ti! Y gracias **Josep, Oriol y Francesc** por las tantas veces que me han hecho reír tomando el café.

Gracias **Blanca**, por todos los ratones que has inyectado por mí. Por que siempre tuviste la mejor predisposición para ayudarme con ellos. Por las veces que has resucitado a los ratones con masajes torácicos para evitar que me pusiera a llorar desconsoladamente. Por alegrarte cada vez que te contaba que el experimento iba bien. Por tus abrazos y besos cuando me viste triste. Gracias **Agnés**, por ayudarme con las inmunohistoquímicas y con el criotomo aproximadamente unas mil veces. Gracias **Marga y Ernest**, por la súper buena onda que tienes con todo el mundo!

Gracias a **Yolanda y Raquel** del Servicio de Bioquímica Clínica de la Facultad de Veterinaria por ayudarme en este proyecto. Y gracias a **Montse** del Servicio de Hematología Clínica de la Facultad Veterinaria porque más allá de ayudarme con los hemogramas, me has entregado tu amistad.

Gracias a mis amigos de la facultad, por todas las sonrisas que me han dado en estos 5 años, por ser mi familia adoptiva, por las tantas y tantas cervezas tomadas juntos, por cuidarme, por demostrarme que la amistad es simplemente 'luz'. No sé que habría sido estos 5 años sin ustedes. Son lo más grande que me llevo de Barcelona. Gracias **Nilza**, por tu alegría, por enseñarme la simpleza de las cosas y por demostrarme que el mundo lleva un ritmo más lento que el mío. Gracias **Jaume**, por siempre abrazarme, por hacerme reír y por quererme. Gracias **Mercé**, porque nunca me negaste una sonrisa, por crear a las 'flores azules' y por enseñarme que los sueños se deben perseguir cueste lo que cueste. Gracias **Ester**, porque eres mi pilar y mi conciencia, por tantas estadísticas que has hecho por mí, por ayudarme con mi inglés y por sobretodo por creer siempre en mí. Y gracias **Eva**, porque eres la persona más maravillosa que he conocido, conozco y conoceré en mi vida. No puedo imaginar mi vida en Barcelona sin ti. Te debo lo que soy ahora. Nunca podré dejar de decirte que te quiero, que te admiro y que estoy orgullosa de ser tu amiga. Gracias por apoyarme en cada paso que he dado, en sostenerme cuando he sentido que no puedo más y por enseñarme que la vida es el

mejor regalo del universo. No tengo palabras de agradecimientos hacia ti. Te quiero tanto Eva Creus!

Antes de dar las gracias a mis compañeros del Departamento de Patología Médica quisiera entregar mis más sinceros agradecimientos a una persona que me ha ayudado mucho. Gracias **Santiago**, por las comidas y cenas compartidas, por tu preocupación de que esta tesis se desarrollara correctamente, por estar a mi lado y, sobretodo, por darme tu apoyo en el momento en que más lo necesité. Tus palabras, tus e-mails, fueron muy valiosos para mi. Gracias a mis compañeros de departamento: **Grego, Carlo, Kiko el 'sherpa', Jorge, Ana Luisa, Cinzia, Martina, Paolo, Marta, Oscar, Laura y Roser**, por todas las veces que me han ayudado, por todas las veces que me han hecho reír y por las muchas cenas y excursiones que hemos compartido a lo largo de estos años. Especialmente gracias a **Encarna**, por hacerme siempre todos los trámites universitarios y porque siempre que lo he necesitado he tenido tu abrazo. Eres una grande!

Gracias a mis amigos de toda la vida. Porque a la distancia siempre me han apoyado, por darme siempre palabras de aliento, por alegrarse de mis logros, por sus consejos siempre tan sabios y por recordarme que la distancia y el tiempo no degrada la amistad verdadera. Gracias **DziDzi, Joyce, Paula, Dani, Berni y Carola Lagostena**. Gracias **Carola Campos y Milena**, por todo el apoyo que me han entregado este último año. Gracias **Mario**, porque esta aventura catalana ha sido fruto de ti, por tranquilizar y frenar mis ataques de impulsividad, por creer en mí desde hace ya tantos años y por cuidar a la Josefa. Gracias **Ceci**, por todas las veces que me has escuchado, por no recordarme mis cambios de opiniones, por decirme esas verdades que nunca nadie quiere escuchar y por quererme así tan puramente. Y especialmente gracias **Carola Cousiño**, por ser la amiga que todos queremos tener y por siempre estar ahí. Porque me has regalado mis mejores ataques de risas aunque te haya estado contando una desgracia y, simplemente, gracias por todos los momentos que hemos vivido (y envejecido!) juntas.

Gracias **Maca**, porque en estos años viviendo en Barcelona hemos descubierto esta ciudad juntas, por todas las buenas ondas que me has entregado en este tiempo y por regalarme miles de momentos chilenos en el extranjero. Gracias **Eli**, porque me has enseñado de la vida, de literatura, de cine, de arte, de música, de filosofía, de zapatos y de veterinaria. Por tus e-mails nocturnos y por siempre escucharme. No pierdas nunca tu identidad nacional! Gracias **Paloma y Maite**, porque desde que llegué a España me regalaron una amistad incondicional,

verdadera y magnífica. Porque siempre he podido sostenerme en ustedes. Gracias **Owo!** por hacer la portada tan linda de esta tesis!

Gracias **Diego!** sin ti no termino el doctorado y lo sabes. Estuviste siempre en contra de mi idea de dejar el doctorado pero me conoces tanto que sabías que tenías que detenerme. Gracias Diego por detener esa decisión, que hoy, hubiese sido equivocada. Tú has sido mi fortaleza. A ti te ha tocado vivir mis momentos más difíciles: cuando despertaba de mal humor, cuando llegaba a casa cansada y muda, cuando las cosas se me enredaron tanto que no supe como seguir caminando. Gracias Diego por tu generosidad, tu paciencia, tu honestidad, tu alegría y por escucharme atentamente cuando hablaba de células, ratones y virus. Por tus críticas constructivas, por flipar a mi lado, por escribir cuentos junto conmigo, por leerme poesías, por las tertulias de a dos, por aguantar que el disco de Jack Johnson o el de Moby cantasen una vez y otra más y otra más y otra más.... Y por regar al palto! Gracias por preocuparte de que comiese y durmiese como una princesa. Gracias Diego por estar a mi lado, cada día, acompañándome. A tu lado, ha sido todo más fácil. Gracias **Domi Varas!** porque tus patitas me han acompañado este año por todos lados. Por mirarme obsesionadamente y por aprender a hacer yoga junto conmigo.

Finalmente quiero agradecer a mi **familia**. A mis padres, hermanos, tíos, primos y sobrinos, por todas las veces que me 'llenaron de comida' en mis vacaciones en Chile y sobretodo por la preocupación, apoyo, energía y amor que me han ayudado a llegar hasta aquí. Ustedes son lo más importante de mi vida! Gracias especialmente a mis abuelos, **Papá Oscar, Mirma y Mami Lucy**, porque me han seguido cuidando tanto, tanto, tanto, tanto, tanto, como cuando era una niña, por enseñarme a ser una mujer valiente y por enseñarme lo más valioso de mi vida. A **Benjita**, por que me mantienes en tu vida a cada instante. Eres mi gran razón de volver. A mis hermanos, **Feña y Oscar**, por que sin ustedes no seríamos la familia que somos. Por ayudarme en todos los trámites legales en Chile y por que en cada uno de mis regresos a Chile me mimaron sin parar. Gracias hermanos, por esconderme siempre los malos momentos solamente para que yo fuese feliz. Y las GRACIAS más grande a mi **Mamá**. No hay palabras para ti mamá. Porque siempre me has apoyado y ayudado aunque no estuvieses de acuerdo. Por las maravillosas bienvenidas que me has dado, por tu pastel de zapallitos italianos, por compartir tu cama conmigo, por cuidarme al Dony, a la Josefa y al Rai, por llorar conmigo, por reír conmigo y por hacerme sentir tan especial como lo eres tú. Sin duda, eres la mejor mujer del mundo! te lo prometo!

TABLA DE ABREVIATURAS

%	Tanto por ciento
Δ24	Deleción delta 24, deleción de 24 pares de bases
Å	Amstrongs
Ad5	Adenovirus serotipo 5
ADN	Ácido desoxiribonucleico
AFP	α-fetoproteína
AKT	Proteína quinasa B
ALT	Alanina aminotranspeptidasa
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	En inglés, <i>American Type Culture Collection</i>
BSA	En inglés, <i>Bovine Serum Albumin</i>
CAR	En inglés, <i>Coxsackie and Adenovirus Receptor</i>
CAV	Adenovirus canino
CD4+	En inglés, <i>Cluster of Differentiation 4</i>
CD8+	En inglés, <i>Cluster of Differentiation 8</i>
CE	Extracto celular
CEC	Extracto celular clarificado
Cel/cell	Célula
Cik	En inglés, <i>cytokine-induced killer cells</i>
CMV	Citomegalovirus
CPA	Ciclofosfamida
C-terminal	Carboxi-terminal
CTL	Linfocitos T citotóxicos
DC	Célula dendrítica
ddNTP	Trifosfato de dideoxinucleósido
DMEM	En inglés, <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Di-metil-sulfóxido
DS	Desviación Estándar
dNTP	Trifosfato de deoxinucleótidos
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetra acético
FBS	Suero Fetal Bovino
FELASA	En inglés, <i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
FC	Frecuencia cardiaca
FR	Frecuencia respiratoria
g	Fuerza G
gr	gramos
GAPDH	En inglés, <i>Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase</i>
GFP	En inglés, <i>Green Fluorescent Protein</i>
GGT	Gama glutamil transpeptidasa
GM-CSF	Factor estimulador de la formación de colonias de macrófagos y granulocitos
GY	En inglés, <i>Gray units</i>
h	horas
hAd	En inglés, <i>human adenovirus</i>

HGF	En inglés, <i>Hepatocyte growth factor</i>
hTERT	En inglés, <i>Human Telomerase Reverse Transcriptase</i>
HSV	En inglés, <i>Herpes Simplex Virus</i>
IC₅₀	Concentración inhibitoria 50
IGF-1	En inglés, <i>Insulin-like growth factor-1</i>
IGFBPs	En inglés, <i>IGF binding proteins</i>
Imm	Inmunizados/Inmunización
ITR	Repetición terminal invertida
ip	Intraperitoneal
it	Intratumoral
iv-ev	Endovenoso
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
MHC	Complejo de histocompatibilidad principal
MLP	Promotor principal tardío del adenovirus
ml	Mililitro
mg	Milígramo
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mm³	Milímetro cúbico
MMP	Metaloproteinasas
m.o.i	En inglés, <i>Multiplicity Of Infection</i>
mARN	ARN mensajero
MTP	Muramil tripeptido
MV	En inglés, Measles Virus (Virus del Sarampión)
NAB's	En inglés, <i>Neutralizing antibodies</i>
NALP3	En inglés, <i>Nacht Domain-, Leucine-Rich Repeat-, and PYD-Containing Protein 3</i>
NK	En inglés, <i>Natural Killer Cells</i>
nm	Nanómetro
nM	Nanomolar
N-terminal	Amino-terminal
°C	Grados centígrados
OC	En inglés, <i>osteocalcin promoter</i>
OCCA	En inglés, <i>Osteocalcin promoter controlled canine adenovirus</i>
OSA	Osteosarcoma
OV	En inglés, <i>Oncolytic Virus</i>
PAMPs	En inglés, <i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
p.i.	Post-infección o post-inyección
P/S	Penicilina/estreptocitosina
pb	Pares de bases
PBS	Tampón salino fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PRR	En inglés, <i>Receptors Recognition Pattern</i>
PSA	Antígeno específico de próstata
PTEN	En inglés, <i>phosphatase and tensin homolog</i>
RGD	Arginina-Glicina-Ácido Aspártico
RB	Retinoblastoma

RLU	En inglés, <i>Relative Light Units</i>
RT-PCR	PCR a tiempo real
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
SE	Error estándar
SN	Sobrenadante
TA	Temperatura ambiente
TAE	Tris-acetato-EDTA
TE	Tris-EDTA
TL	<i>En inglés, Track-luc</i>
TLR9	<i>En inglés, Toll-like receptor 9</i>
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
TRIS	En inglés, <i>hidroximetil aminometano</i>
TP	Proteína terminal
TU	En inglés, <i>transducing unit (unidades de transducción)</i>
U	Unidades
vp	Partículas virales
VSV	En inglés, <i>Vesicular Stomatitis Virus</i>
μg	Microgramo
μl	Microlitro
μm	Micrómetro
XR	Radiación Ionizante

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	5
III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
1. Osteosarcoma	9
1.1 Incidencia y factores de riesgo	9
1.2 Etiología	9
1.3 Patogenia	11
1.4 Localización, signos clínicos y técnicas diagnósticas	11
1.4.1 Localización de las lesiones	12
1.4.2 Signos clínicos	13
1.4.3 Técnicas diagnósticas	13
1.5 Factores pronósticos y tratamiento	14
2. La viroterapia del cáncer	15
2.1 Historia de la viroterapia	16
3. Adenovirus oncolíticos	17
3.1 Estructura de adenovirus canino	18
3.2 Biología de los adenovirus	18
3.3 Selectividad tumoral de adenovirus oncolíticos	20
3.3.1 Deleciones de genes virales que otorgan selectividad tumoral	21
3.3.2 Control de la replicación viral mediante el uso de promotores específicos de tumor	22
3.3.2.1 Direccionamiento transcripcional	22
3.3.2.2 Promotor de osteocalcina	22
3.3.3 Direccionamiento de la infectividad viral: Direccionamiento transduccional	24
3.4 OCCAV	24
3.5 Barreras para el transporte de los virus oncolíticos	25
3.5.1 Anticuerpos neutralizantes	28
4. Células transportadoras: vehículos para el transporte sistémico de virus oncolíticos	29
4.1 Fases del transporte mediado por células	30
4.1.1 Fase I: Infección <i>in vitro</i>	30
4.1.2 Fase II: Transporte sistémico	31
4.1.2.1 Selectividad asociada a célula tumoral	32
4.1.2.2 Selectividad asociada a características biológicas del tumor	32

4.1.2.3 Selectividad asociada a la localización anatómica	33
4.1.3 Fase III: Producción viral en el tumor	33
4.2 Células tumorales como transportadoras de virus oncolíticos	34
IV. OBJETIVOS	39
V. MATERIALES Y MÉTODOS	43
1. Caracterización de adenovirus recombinante	43
1.1 Generación adenovirus recombinantes	43
1.1.1 Selección de clones de adenovirus recombinantes para el ensayo de formación de calvas	43
1.1.2 Amplificación y purificación de adenovirus	44
1.1.2.1 Amplificación de adenovirus	45
1.1.2.2 Purificación de adenovirus	46
1.2. Técnicas empleadas para titular adenovirus	48
1.2.1 Determinación de las partículas físicas por espectrometría	48
1.2.2 Determinación de las partículas virales infectivas	48
1.3. Técnicas utilizadas para la caracterización de adenovirus	50
1.3.1 Obtención del ADN viral	50
1.3.1.1 Obtención del ADN de adenovirus a partir del sobrenadante de células infectadas	50
1.3.1.2 Obtención del ADN de adenovirus a partir de células infectadas (Hirt's)	50
1.3.1.3 Obtención del ADN de adenovirus a partir virus purificado	51
1.3.2 Digestión con enzimas de restricción y secuenciación del ADN de adenovirus	51
1.3.2.1 Digestión con enzimas de restricción	52
1.3.2.2 Reacción de secuenciación	52
1.4. Ensayos <i>in vitros</i> con adenovirus recombinantes	53
1.4.1 Características de las líneas celulares	53
1.4.1.1 Líneas celulares para el trabajo con adenovirus	53
1.4.1.1.1 Células DkCre	53
1.4.1.1.2 Células HEK293	54
1.4.1.2 Líneas tumorales caninas	54
1.4.2 Condiciones de cultivos de las líneas celulares	54
1.4.3 Recuento celular	55
1.4.4 Congelación y descongelación de las líneas celulares	55
1.4.5 Control de micoplasma en las líneas celulares en cultivo	56
1.4.6 Ensayo de producción y liberación viral de adenovirus recombinante	57

1.4.7 Análisis de la citotoxicidad	58
1.4.8 Medida de la actividad de luciferasa	59
2. Técnicas utilizadas en los ensayos <i>in vivo</i> y en el estudio en perros de las células tumorales caninas infectadas con OCCAV	60
2.1 Cepas de ratones utilizadas y condiciones de estabulación	60
2.2 Implantación subcutánea de células tumorales en ratones	60
2.3 Administración de adenovirus	61
2.3.1 Inmunización en ratones	61
2.3.2 Inyección intratumoral de las células cargadas con adenovirus y de adenovirus	62
2.3.3 Inyección sistémica de las células cargadas con adenovirus y de adenovirus	62
2.4 Inmunosupresión con ciclofosfamida	63
2.5 Obtención de muestras	63
2.5.1 Obtención de muestras de sangre y suero	63
2.5.2 Obtención de tumores y órganos	64
2.5.2.1 Inclusión de tejidos en parafina	64
2.5.2.2 Inclusión de tejidos en OCT	65
2.6 Evaluación de la eficiencia de transducción <i>in vivo</i>	65
2.6.1 Cuantificación de la actividad de luciferasa en extractos tisulares	65
2.6.2 Estudio de la distribución de GFP en pulmón, hígado y tumor	66
2.7 Ensayo de neutralización de anticuerpos anti-adenovirus	67
2.8 Técnicas histológicas	67
2.8.1 Obtención de cortes histológicos	67
2.8.1.1 Cortes histológicos parafinados	68
2.8.1.2 Cortes histológicos congelados	68
2.9 Inmunohistoquímicas	68
2.9.1 Inmunohistoquímica en tejidos parafinados	68
2.9.2 Inmunohistoquímica en cortes congelados	70
3. Técnicas específicas utilizadas en el estudio preliminar de toxicidad y liberación de OCCAV en perros con osteosarcoma inyectados con células tumorales infectadas con OCCAV	71
3.1 Pacientes	71
3.2 Monitorización clínica en perros	72
3.3 Obtención de muestras	72
3.3.1 Obtención de muestras de orina	72
3.3.2 Obtención de saliva	72
3.4 Determinación de las partículas virales por tinción del hexón en orina y saliva	72
3.5 Determinación de las partículas virales por PCR a tiempo real en sangre y órganos	73
3.5.1 Preparación de las muestras	73

3.5.1.1 Obtención de ADN de extractos tisulares y del suero	73
3.5.2 RT-PCR	74
VI. RESULTADOS	79
1. Caracterización del adenovirus recombinante canino OCCAV	80
1.1 Producción viral de OCCAV respecto al CAV2	80
1.2 Comparación de la producción viral de OCCAV en células tumorales irradiadas y no irradiadas	82
1.3 Capacidad oncolítica de OCCAV respecto al CAV2	83
2. Análisis de la biodistribución y eficacia antitumoral de las células tumorales caninas infectadas con OCCAV	84
2.1 Comparación del patrón de biodistribución <i>in vivo</i> de las células tumorales caninas infectadas con OCCAV respecto a OCCAV desnudo	84
2.1.1 Determinación de títulos de anticuerpos neutralizantes	85
2.1.2 Análisis de la biodistribución de AdTL transportado por células tumorales caninas y de AdTL desnudo en presencia de anticuerpos neutralizantes	86
2.2 Análisis de la eficacia antitumoral <i>in vivo</i> de las células tumorales caninas infectadas con OCCAV	90
2.2.1 Análisis de la expresión de osteocalcina en tumores xenoinjertados de células Abrams	90
2.2.2 Análisis de la eficacia intratumoral de las células tumorales caninas infectadas con OCCAV	91
2.2.2.1 Análisis de la eficacia intratumoral de las células tumorales caninas infectadas con OCCAV a dosis única	91
2.2.2.2 Análisis de la eficacia intratumoral de las células tumorales caninas infectadas con OCCAV a dosis múltiple	92
2.2.3 Análisis de la eficacia sistémica de las células tumorales caninas infectadas con OCCAV	93
2.2.4 Efecto de la inmunización en la actividad antitumoral de las células tumorales D17 infectadas con OCCAV respecto a OCCAV desnudo	96
2.2.5 Efecto de la inmunosupresión con ciclofosfamida en la actividad antitumoral de las células tumorales D17 infectadas con OCCAV respecto a OCCAV desnudo	99
3. Estudio preliminar de toxicidad y eliminación en perros con osteosarcoma inyectados con células tumorales infectadas con OCCAV	105
3.1 Datos preliminares de un estudio de toxicidad y eliminación en un perro con osteosarcoma inyectado con células tumorales caninas infectadas con OCCAV por vía intratumoral	105
3.1.1 Características del paciente	106

3.1.1.1 Análisis de la expresión de osteocalcina	106
3.1.2 Toxicidad relacionada al tratamiento	107
3.1.2.1 Eventos clínicos adversos	107
3.1.2.2 Datos de laboratorio	107
3.1.3 Determinación de los anticuerpos neutralizantes	109
3.1.4 OCCAV en orina, saliva y sangre	110
3.1.5 Resultados de la necropsia	110
3.2 Datos preliminares de un estudio de toxicidad y eliminación en un perro con osteosarcoma inyectado con células tumorales caninas infectadas con OCCAV por vía sistémica	112
3.2.1 Características del paciente	112
3.2.1.1 Análisis de la expresión de osteocalcina	112
3.2.2 Toxicidad relacionada al tratamiento	113
3.2.2.1 Eventos clínicos adversos	113
3.2.2.2 Datos de laboratorio	114
3.2.3 Determinación de los anticuerpos neutralizantes	116
3.2.4 OCCAV en orina, saliva y sangre	116
VII. DISCUSIÓN	121
1. Células de osteosarcoma canino transportadoras de virus oncolítico como estrategia para evadir los anticuerpos neutralizantes	121
2. Sistema celular de transporte de OCCAV como estrategia terapéutica antitumoral de osteosarcoma canino	127
3. Administración de células infectadas con OCCAV: estudio preliminar	133
VIII. CONCLUSIÓN	142
IX. BIBLIOGRAFÍA	145

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Histopatología de un Osteosarcoma	13
Figura 2. Propagación intratumoral de virus oncolíticos	16
Figura 3. Estructura y organización genómica de adenovirus canino tipo 2	20
Figura 4. Mecanismo de selectividad de OCCAV	25
Figura 5. Barreras que dificultan la distribución de adenovirus oncolíticos en los tumores <i>in vivo</i>	27
Figura 6. Fases secuenciales en el transporte mediado por células de virus oncolíticos	31
Figura 7. Niveles de dianas tumorales por las células transportadoras	32
Figura 8. Curvas de amplificación correspondiente a toda la reacción de PCR	74
Figura 9. Caracterización de OCCAV	81
Figura 10. Efecto de la irradiación post-infección en la producción viral de OCCAV	83
Figura 11. Perfil de citotoxicidad de adenovirus canino OCCAV respecto a adenovirus CAV2	84
Figura 12. Evaluación del desarrollo de anticuerpos neutralizantes anti-Ad5 después de la inmunización con AdTL	85
Figura 13. Análisis de la transducción pulmonar de adenovirus transportado por un sistema celular en un modelo inmunizado de osteosarcoma canino	87
Figura 14. Análisis de la transducción hepática de adenovirus transportado por un sistema celular en un modelo inmunizado de osteosarcoma canino	88
Figura 15. Análisis de la transducción tumoral de adenovirus transportado por un sistema celular en un modelo inmunizado de osteosarcoma canino	89
Figura 16. Análisis de la expresión de osteocalcina en tumores xenoinjertados de osteosarcoma canino	91
Figura 17. Análisis de la actividad antitumoral de las células tumorales caninas infectadas con OCCAV en un modelo tumoral de osteosarcoma canino	92
Figura 18. Análisis de la actividad antitumoral de las células tumorales caninas infectadas con OCCAV y de OCCAV desnudo en un modelo xenoinjertado de osteosarcoma canino	94
Figura 19. Análisis de la actividad antitumoral de las células tumorales caninas infectadas con OCCAV administradas sistémicamente en un modelo xenoinjertado de osteosarcoma canino	95
Figura 20. Análisis de la actividad antitumoral de las células tumorales D17 infectadas con OCCAV respecto a OCCAV desnudo en un modelo inmunizado xenoinjertado de osteosarcoma	97
Figura 21. Análisis inmunohistoquímico de OCCAV en tumores Abrams	99
Figura 22. Evaluación del efecto inmunosupresor de la ciclofosfamida (CPA) en	101

la respuesta de los anticuerpos neutralizantes y en el recuento leucocitario en un modelo inmunizado xenoinjertado de osteosarcoma canino	
Figura 23. Análisis de la actividad antitumoral de las células tumorales D17 infectadas con OCCAV respecto a OCCAV desnudo en un modelo xenoinjertado de osteosarcoma inmunizado más CPA	103
Figura 24. Detección inmunohistoquímica de OCCAV en muestras de tumores Abrams inyectados con células D17 cargadas con OCCAV en un modelo xenógrafo de osteosarcoma canino inmunosuprimido	104
Figura 25. Análisis de la expresión de osteocalcina por las células tumorales de osteosarcoma canino	106
Figura 26. Perfil hematológico obtenido posterior a la administración intratumoral del sistema celular infectado con OCCAV	108
Figura 27. Cinética del título de anticuerpos neutralizantes en un paciente canino inyectado por vía intratumoral con células tumorales infectadas con OCCAV	109
Figura 28. Análisis de la replicación viral en células del tumor primario de osteosarcoma canino inyectado por vía intratumoral con un sistema celular infectado con OCCAV (3×10^8 cel/perro)	111
Figura 29. Análisis de la expresión de osteocalcina por las células tumorales de osteosarcoma canina	113
Figura 30. Perfil de parámetros fisiológicos obtenidos tras la administración sistémica del sistema celular infectado con OCCAV	113
Figura 31. Perfil hematológico obtenido tras la administración sistémica del sistema celular infectado con OCCAV	115
Figura 32. Cinética del título de anticuerpos neutralizantes en un paciente canino inyectado por vía sistémica con células tumorales infectadas con OCCAV	116
Figura 33. Cinética de cuantificación en sangre tras la administración sistémica del sistema celular infectado con OCCAV	117

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de Osteosarcoma canino	12
Tabla 2. Direccionamiento transcripcional: Resumen de algunos adenovirus oncolíticos con genes tempranos controlados por promotores específicos	23
Tabla 3. Ejemplos de vehículos celulares para el transporte sistémico de vectores virales	33
Tabla 4. Resumen de algunos virus oncolíticos transportados por células	35
Tabla 5. Secuencia aminoacídica de los cebadores utilizados para la secuenciación de adenovirus	53
Tabla 6. Secuencia aminoacídica de los cebadores utilizados para la detección de micoplasma	56
Tabla 7. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en las inmunohistoquímicas en tejidos parafinados	69
Tabla 8. Secuencia nucleotídica de los cebadores y sonda utilizadas para la cuantificación de genomas virales por RT-PCR	75
Tabla 9. Efecto de la inmunización en la llegada de virus a tejidos/órganos	88
Tabla 10. Beneficio de la estrategia terapéutica en la llegada de virus a tejidos/órganos	90
Tabla 11. Perfil bioquímico sanguíneo posterior a la administración intratumoral de células tumorales caninas infectadas con OCCAV	109
Tabla 12. Determinación absoluta del número de genomas virales en muestras de órganos cuantificada por PCR a tiempo real, utilizando una sonda taqman y cebadores para detectar la región E1A de OCCAV	111
Tabla 13. Perfil bioquímico sanguíneo posterior a la administración sistémica de células tumorales caninas infectadas con OCCAV	114

I. RESUMEN

El osteosarcoma es el tumor óseo más frecuente que afecta al perro. En veterinaria, las opciones para su manejo terapéutico son limitadas y el pronóstico para estos pacientes es pobre. Los adenovirus oncolíticos son una atractiva herramienta de tratamiento experimental ya que se pueden replicar y extender dentro del tumor para inducir directamente la destrucción del tejido tumoral. Sin embargo, el mayor impedimento de la administración sistémica de los adenovirus oncolíticos es la presencia de anticuerpos neutralizantes preformados. Éste obstáculo puede ser resuelto administrando el adenovirus oncolítico dentro de una célula transportadora capaz de ocultar los antígenos virales durante el transporte sistémico. Las células tumorales tienen tropismo tumoral, lo que permite su utilización como potenciales vehículos de transporte. En este trabajo, se estudió la capacidad de las células tumorales caninas infectadas con adenovirus oncolítico *in vitro* y administradas sistémicamente para escapar de las defensas antivirales, alcanzar el sitio tumoral y, subsecuentemente, de liberar la progenie viral para infectar a la célula tumoral diana en un modelo xenoinjertado de osteosarcoma canino. Los estudios *in vivo* utilizando células tumorales transportadoras demostraron el eficiente transporte sistémico de adenovirus oncolítico al tumor, incluso en presencia de anticuerpos anti-adenovirus. Al contrario, la presencia de anticuerpos anti-adenovirus redujeron el transporte del virus desnudo al tumor. La administración intratumoral y sistémica de las células transportadoras infectadas con un adenovirus canino de replicación selectiva (OCCA)V mostró una disminución significativa en el crecimiento del tumor comparado con la inyección del virus desnudo en presencia de altos títulos de anticuerpos neutralizantes. La inmunosupresión con ciclofosfamida no afectó la actividad terapéutica de las células tumorales infectadas con OCCAV, pero resultó en un beneficio terapéutico respecto al virus desnudo. Por otro lado, la administración intratumoral y sistémica de células tumorales infectadas con OCCAV en dos perros con osteosarcoma fue bien tolerada. En conjunto, estos hallazgos soportan la idea de la administración por vía sistémica del sistema celular infectado con virus oncolítico para el tratamiento del osteosarcoma canino.

II. INTRODUCCIÓN

El aumento de la incidencia y prevalencia de cáncer en la especie canina se debe principalmente a las mayores expectativas de vida de los perros en la actualidad. Los avances en la nutrición, en el control de las enfermedades infecciosas mediante vacunación, en el desarrollo de una mejor medicina veterinaria junto con la motivación de los propietarios de realizar nuevas terapias en sus animales han elevado la esperanza de vida en esta especie. Por este motivo, el cáncer se ha convertido en una de las principales causas de muerte en la población canina mundial. Se estima que sólo en los EEUU se diagnostican más de un millón de muertes anuales por cáncer en esta especie. Hoy en día, las opciones terapéuticas antineoplásicas en medicina veterinaria incluyen la cirugía, radioterapia, hipertermia, terapia fotodinámica, inmunoterapia y quimioterapia. Sin embargo, debido a que el objetivo de cualquier tratamiento en medicina veterinaria es la curación preservando el bienestar animal es que muchas veces no se logra la recuperación de la salud en el animal. De ahí que muchos protocolos antitumorales que en medicina humana son curativos, en medicina veterinaria no lo son ya que afectan dramáticamente la calidad de vida del animal. En los últimos años, el avance en el conocimiento de los procesos moleculares del cáncer, junto con el descubrimiento de nuevas drogas antitumorales no han aumentado la supervivencia de pacientes caninos con enfermedad metastásica o con tumores refractarios a los tratamientos convencionales, debido principalmente a que las células tumorales desarrollan mecanismos de resistencia a la apoptosis inducida por la quimioterapia o la radioterapia. De ahí la necesidad de desarrollar nuevas terapias que sean efectivas en el tratamiento del cáncer en el perro, pero que tengan un bajo perfil de toxicidad, un mecanismo de acción efectivo en células resistentes a la apoptosis y que sean sinérgicos con los tratamientos convencionales.

La generación espontánea de tumores en el perro hace de esta especie animal un importante modelo, a través del cual podemos obtener datos útiles para el cáncer humano, ya sea a nivel de la biología del cáncer o de nuevas estrategias terapéuticas. Dentro de las características que hacen del perro un modelo para el cáncer humano se incluyen: (a) Mayor homología genética que existe entre el perro y el hombre, que entre el hombre y el ratón; (b) Comparten el mismo medio ambiente y por lo tanto los mismos factores de riesgo medioambientales; (c) Corresponde a una población exogámica en comparación a la endogámica de laboratorio; (d) Presentan tumores de generación espontánea y por lo tanto la biología y el comportamiento tumoral es similar al del hombre; y (e) La toma de muestras biológicas y la obtención de imágenes es rápidamente aplicable. Por otro

lado, las similitudes que existen entre el osteosarcoma (OSA) canino y el osteosarcoma humano hacen del perro un buen modelo animal para la investigación de esta enfermedad. Las similitudes ya descritas incluyen variables tales como el peso corporal, la localización del tumor, la etiología, las alteraciones genéticas, la tasa y lugar de metástasis, la respuesta al tratamiento con quimioterapia y los factores pronósticos de la enfermedad.

III. Revisión Bibliográfica

1. OSTEOSARCOMA

1.1 INCIDENCIA Y FACTORES DE RIESGO

El osteosarcoma es el tumor óseo primario más frecuente en perros, representando más del 85% de todas las patologías óseas y el 5% de todos los tumores primarios. En EEUU su incidencia es de más de 8.000 casos anuales, siendo ésta una cifra subestimada ya que no todos los casos son confirmados (Mueller et al., 2007).

El osteosarcoma afecta principalmente a perros adultos o viejos, con una media de edad de 7 años; aunque se ha descrito un pequeño pico de incidencia entre los 18 y 24 meses de edad (Misdorp and Hart, 1979). El osteosarcoma es un tumor de razas grandes o gigantes, siendo el peso y especialmente la altura el principal factor predictivo en el perro (Weller et al., 1979). Las razas más afectadas son el San Bernardo, Gran Danés, Setter Irlandés, Pastor alemán, Doberman pinscher y Golden retriever. Además, los machos se ven levemente más afectados que las hembras (1.1-1.5:1).

1.2 ETIOLOGÍA

La etiología del osteosarcoma canino es desconocida. Una de las teorías propuestas son la preexistencia de múltiples pequeños traumas y subsecuente lesión de las células sensibles en la fisis de los huesos, que inducen señales mitogénicas que aumentan la probabilidad de desarrollar la enfermedad. Otras teorías apuntan al desarrollo del osteosarcoma canino asociado con el uso de implantes metálicos en la reparación de fracturas, osteomielitis crónica, procesos inflamatorios crónicos o asociados a una complicación de la radioterapia. Sin embargo, las últimas investigaciones en el campo de la biología molecular junto con los datos clínicos, respaldan un origen genético en el desarrollo del osteosarcoma.

Datos recientes indican que las vías supresoras de tumor juegan un papel importante en la patogénesis del osteosarcoma. Son frecuentes alteraciones en los genes p53 y retinoblastoma (Rb), que contribuyen a la iniciación del tumor (Fuchs and Pritchard, 2002; Wang, 2005). La proteína p53 actúa como un regulador de la integridad celular y mutaciones a este nivel producen una desregulación de la

replicación en la célula tumoral. Estudios previos han descrito que en el osteosarcoma canino la frecuencia de mutaciones en p53 fue de un 47% para el osteosarcoma apendicular (Johnson et al., 1998) o bien de un 24% (van Leeuwen et al., 1997) ó 38% (Mendoza et al., 1998) para el osteosarcoma primario. Asimismo, en líneas celulares de osteosarcoma también se demostró la presencia de mutaciones en p53 (Levine and Fleischli, 2000). La proteína RB (pRB) bloquea la proliferación celular controlando la disponibilidad y actividad de miembros específicos de la familia de factores transcripcionales E2F que controlan la progresión de G1 a la fase S del ciclo celular (Weinberg, 1995). Si la vía pRb se trunca, la célula se hace insensible a los factores antiproliferativos que bloquean el paso a la fase G1 del ciclo celular y la consecuencia es un ciclo celular descontrolado. En el osteosarcoma humano mutaciones en el gen RB alcanzan a más del 60% de los tumores (Feugeas et al., 1996), mientras que en el perro la frecuencia de mutaciones a este nivel aún son desconocidas (Mendoza et al., 1998). Sin embargo, las líneas celulares de osteosarcoma canino contienen mutaciones que indirectamente inactivan los 3 miembros de la familia Rb: pRB, p107 y p130, simultáneamente (Levine and Fleischli, 2000). Otro importante gen supresor tumoral es PTEN, que regula la proliferación celular, la migración y la supervivencia, así como también la angiogénesis e invasividad de las células tumorales (Mueller et al., 2007). En líneas celulares de osteosarcoma canino se determinaron niveles altos de expresión de la forma fosforilada de AKT, que es un indicador indirecto de la expresión aberrante de PTEN (Levine and Fleischli, 2000).

Aunque muchos proto-oncogenes se encuentran sobrepresados en el osteosarcoma, el papel exacto de esta sobrepresión en la tumorigénesis del osteosarcoma canino aún es desconocido. Se ha determinado que la expresión de erbB-2 en líneas celulares de osteosarcoma canino fue de un 86% y en muestras de tejido tumoral canino fue de un 40% (Flint et al., 2004). Además, se ha determinado que la sobrepresión de los oncogenes IGF-1 (del inglés *Insulin-like growth factor-1*) y IGFbps (del inglés *IGF binding proteins*), que tienen una función regulatoria en la fisiología de los osteoblastos (Canalis et al., 1988) y del HGF (del inglés *Hepatocyte growth factor*) y su receptor c-Met, contribuyen al fenotipo maligno del osteosarcoma canino (Withrow et al., 1991).

1.3 PATOGENIA

El osteosarcoma es un tumor maligno mesenquimal de células óseas blásticas. Estas células producen una matriz extracelular osteoide y la presencia de tumor osteoide corresponde a la base del diagnóstico histológico diferencial del osteosarcoma respecto a otros sarcomas óseos. El patrón histológico del osteosarcoma puede variar entre tumores y dentro del mismo tumor. Existen muchas subclasificaciones de esta enfermedad basadas tanto en el tipo del osteosarcoma (Tabla 1) como en la cantidad de matriz, así como también en características de la célula tumoral, que puede ser osteoblástica, condroblástica, fibroblástica, pobremente diferenciado y telangioectásico (un subtipo vascular). En el osteosarcoma canino no se ha determinado que existan diferencias en el comportamiento biológico del tumor de acuerdo a las subclasificaciones histológicas (Kirpensteijn et al., 1999), aunque si existe una potencial relación entre el grado histológico y el comportamiento metastático de la enfermedad.

El osteosarcoma es un tumor agresivo localmente, causando lisis, producción ósea o ambos procesos. La enfermedad local frecuentemente provoca tumefacción de los tejidos blandos y, a veces, fracturas patológicas. Es poco frecuente que el osteosarcoma cruce de una articulación a otra. Las metástasis son comunes y se inician subclínicamente en etapas tempranas de la enfermedad; aunque menos del 15% de los perros presentan metástasis pulmonares u óseas detectables radiográficamente en el momento del diagnóstico, más del 90% de los animales mueren por la enfermedad metastásica dentro del año del diagnóstico cuando la amputación es el único tratamiento. Aunque las metástasis se diseminan principalmente por vía hematogena, la extensión a linfonodos regionales también puede ocurrir. El principal órgano diana de metástasis es el pulmón y, en menor frecuencia, otros huesos y tejidos blandos. En humanos se ha descrito un aumento en las metástasis óseas después del tratamiento sistémico con quimioterápicos y en perros, si bien esta hipótesis se sospecha, aún no ha sido demostrada (Mueller et al., 2007).

1.4 LOCALIZACIÓN, SIGNOS CLÍNICOS Y TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS

En el perro, el osteosarcoma frecuentemente afecta al esqueleto apendicular o extremidades y en menor frecuencia al esqueleto axial (cráneo, columna, costillas, esternón) y a tejidos extraesqueléticos. Los signos clínicos asociados al

osteosarcoma dependen de la ubicación anatómica del tumor. El diagnóstico definitivo se obtiene mediante histopatología.

TABLA 1. Tipos de osteosarcoma canino

Tipo Tumor	Ubicación Anatómica	Hallazgos Radiológicos	Comportamiento Biológico y Pronóstico	Opciones de Tratamiento
OSA Endosteal	Esqueleto apendicular. Metáfisis huesos largos.	Lisis cortical, reacción periosteal con patrón radiante o en empalizada, neoformación ósea.	90% presenta micrometástasis al momento del diagnóstico. Pronóstico pobre.	Cirugía más quimioterapia adyuvante
OSA Periosteal	Esqueleto apendicular o axial.	Lesión en la superficie del hueso con lisis cortical.	Alta invasividad local, alta metástasis, pobre pronóstico.	Cirugía más quimioterapia adyuvante
OSA Parosteal	Esqueleto apendicular o axial.	Lesión ósea adyacente al hueso, sin destrucción de la cortical.	Mínimamente invasivo, variable (baja) metástasis.	Resección quirúrgica.

1.4.1 Localización de las lesiones

Aproximadamente el 75% de los osteosarcomas en el perro se presentan en el esqueleto apendicular, afectando principalmente la metáfisis de los huesos largos. Las extremidades anteriores presentan el doble de incidencia respecto a las posteriores. Las localizaciones más comunes en la extremidad anterior corresponden al radio distal y al húmero proximal y, en la extremidad posterior al fémur distal, tibia distal, tibia proximal y menos comúnmente en fémur proximal. El osteosarcoma distal a la articulación antebraquiocarpiana y tarsocrural son raras en perros (Gamblin et al., 1995).

El 25% restante de los osteosarcoma se localizan en el esqueleto axial. En orden descendente las zonas de mayor presentación son: mandíbula, maxilar, columna vertebral, cráneo, costillas, cavidad nasal o senos paranasales y pelvis (Heyman et al., 1992).

La incidencia del osteosarcoma multicéntrico es menor al 10% al inicio del diagnóstico de la enfermedad (LaRue et al., 1986). También se ha descrito osteosarcoma extraesquelético en el tejido mamario, bazo, intestino, hígado, testículos, vagina, ojo, ligamento gástrico y glándulas adrenales.

1.4.2 Signos clínicos

Cuando el osteosarcoma se ubica en el esqueleto apendicular el principal signo clínico es cojera, tumefacción o ambas. El dolor se debe a las microfracturas, a la disrupción del periostio inducido por la lisis de la cortical ósea y por la estimulación nerviosa directa generada por el ambiente ácido producido por los osteoclastos (Honore and Mantyh, 2000). Los signos asociados con el osteosarcoma axial son dependientes del sitio anatómico afectado y varían desde sólo tumefacción, con o sin cojera, a disfagia, exoftalmia, dolor al abrir la boca, deformidad facial, secreción o hiperestesia, con o sin signos neurológicos.

Es poco frecuente observar signos respiratorios como una primera evidencia clínica de metástasis pulmonar. Con metástasis pulmonar radiográficamente detectable, los perros pueden seguir siendo asintomáticos por muchos meses. La osteopatía hipertrófica puede desarrollarse en perros con metástasis pulmonar.

1.4.3 Técnicas diagnósticas

El diagnóstico del osteosarcoma canino normalmente se realiza a través del estudio radiográfico del área afectada, donde se observan lesiones agresivas en la zona de la metáfisis de huesos largos, de apariencia lítica, blástica o una mezcla de ambas (Wrigley, 2000). Sin embargo, el diagnóstico definitivo se obtiene mediante el estudio histopatológico de la zona tumoral (Fig. 1).

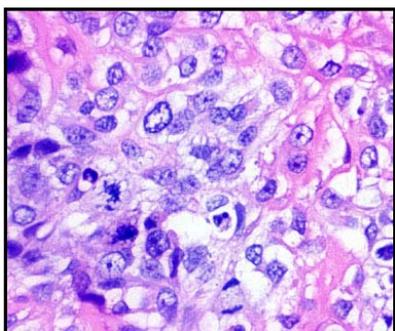


Figura 1. Histopatología de un Osteosarcoma. Osteosarcoma pobremente diferenciado. Se observa una población homogénea de células fusiformes, mitosis y depósitos osteoides (Tinción hematoxilina eosina).

1.5 FACTORES PRONÓSTICOS Y TRATAMIENTO

El principal factor clínico utilizado en el pronóstico del osteosarcoma canino es la presencia de metástasis en el momento del diagnóstico (Dernell WS, 2001). Una vez que la enfermedad metastásica se hace clínicamente detectable, la quimioterapia generalmente se hace inefectiva para prolongar la supervivencia del animal (Ogilvie et al., 1993). Otros factores clínicos que influyen negativamente en el pronóstico son los niveles de fosfatasa alcalina en suero (Ehrhart et al., 1998; Garzotto et al., 2000), el grado histológico del tumor (Kirpensteijn et al., 2002) y la densidad microvascular (Coomber et al., 1998). A nivel molecular la expresión de COX-2 en tumores de osteosarcoma ha sido asociada a una disminución significativa de la esperanza de vida en el perro (86 días *versus* 400 días) (Mullins et al., 2004).

El tratamiento paliativo se recomienda en perros con enfermedad metastásica, que ayuda a controlar el dolor y la cojera asociada al tumor primario, pero no detiene la progresión de la enfermedad ni tampoco aumenta las expectativas de vida comparado con animales que no acceden a ningún tipo de tratamiento.

El tratamiento más frecuentemente utilizado en perros con osteosarcoma consiste en terapia combinada con quimioterapia y cirugía. El tratamiento estándar consiste en resección quirúrgica del tumor primario, seguido de 3 a 6 ciclos de un protocolo de quimioterapia con fármacos derivados del platino o doxorubicina (Berg et al., 1995; Bergman et al., 1996; Kraegel et al., 1991; Shapiro et al., 1988; Straw et al., 1991; Thompson and Fugent, 1992). Con esta terapia, el 50% de los perros sobreviven al año del diagnóstico y el 20% a los dos años (Dernell WS, 2001).

La radioterapia al reducir la inflamación es un tratamiento sintomático efectivo del dolor regional. Provoca necrosis de las células tumorales, que es reemplazada por tejido fibroso, además de neo-formación y calcificación ósea. Recientemente, se ha descrito la utilización de radioterapia intensiva en fases iniciales de la enfermedad con resultados prometedores.

La analgesia es esencial en el tratamiento de perros con osteosarcoma. Al inicio de la enfermedad, el uso de analgésicos no esteroideos es suficiente para controlar el dolor y aumentar la calidad de vida. Sin embargo, en etapas más

avanzadas de la enfermedad es necesario utilizar agentes más potentes como por ejemplo opiáceos o bien una combinación de drogas.

A pesar que en los últimos años la terapia para el osteosarcoma se ha ido refinando, los pacientes con enfermedad metastásica o que no responden a la terapia convencional con quimioterapia siguen teniendo un mal pronóstico. El mejor conocimiento de la biología molecular del osteosarcoma ha ayudado a identificar nuevas dianas terapéuticas que pueden proveer una mayor efectividad antitumoral. Resultados de estudios en pacientes caninos han aportado relevante información para nuevas estrategias terapéuticas para el osteosarcoma humano, ya que la biología del cáncer entre la especie canina y la especie humana es similar. Un ejemplo es un estudio doble ciego randomizado realizado en perros con osteosarcoma de origen espontáneo. El estudio determinó que el muramil tripéptido (MTP), un activador de macrófagos, significativamente prolongaba la vida en perros que habían sido sometidos a amputación (MacEwen et al., 1989). Subsecuentes estudios clínicos en pacientes humanos con osteosarcoma metastático demostraron también un mayor tiempo libre de enfermedad después de una metastatectomía en terapia combinada con muramil tripéptido (Asano and Kleinerman, 1993).

2. LA VIROTERAPIA DEL CÁNCER

La viroterapia o terapia viral del cáncer se conoce como el tratamiento del cáncer con virus oncolíticos. Se basa en la capacidad inherente de ciertos virus de replicarse en células tumorales sin afectar a las células normales. Como consecuencia de la replicación, el virus se amplifica y provoca la lisis de la célula tumoral. Los nuevos viriones producidos se liberan al medio extracelular e infectan a las células tumorales vecinas, propagando así el efecto oncolítico hasta eliminar la masa tumoral (Fig. 2). Las principales ventajas que presenta la viroterapia respecto a las terapias convencionales del cáncer son que la replicación del virus dentro de la célula tumoral permite una amplificación de la dosis inicial utilizada en el tejido diana y que no genera mecanismos de resistencia de la célula tumoral a la terapia.

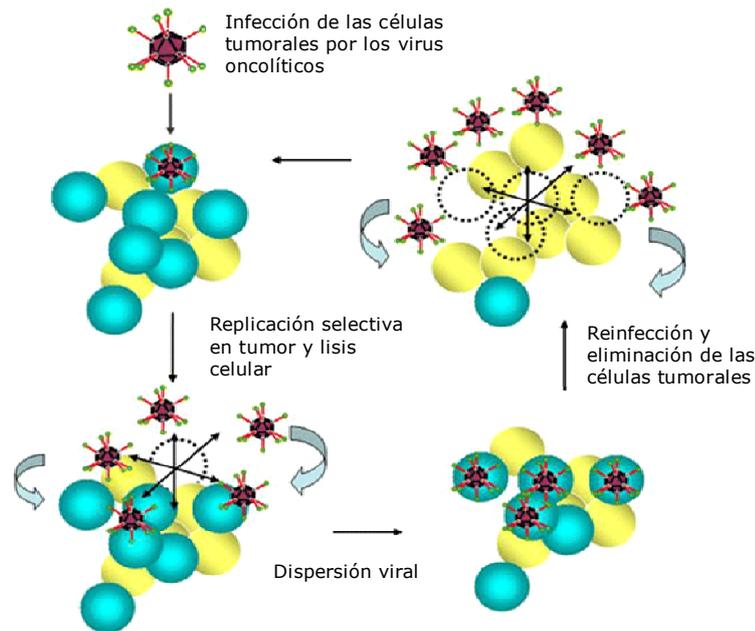


Figura 2. Propagación intratumoral de virus oncolíticos. Los virus oncolíticos se replican selectivamente en la célula tumoral. La replicación del virus da lugar a la muerte de la célula infectada y a la liberación de la progenie viral al medio extracelular. Los nuevos viriones vuelven a infectar más células tumorales, amplificando la dosis inicial de la droga y eliminando la masa tumoral (Hedley et al., 2006).

2.1 HISTORIA DE LA VIROTERAPIA

La viroterapia nace a principios del siglo XX como consecuencia de la observación de remisiones espontáneas en pacientes de cáncer que habían padecido infecciones virales naturales. La mayoría de las remisiones espontáneas observadas ocurrieron en pacientes con leucemia o linfoma, caracterizadas por la importante inmunosupresión que inducen. En 1912, De Pace observó una regresión significativa de un carcinoma del cuello del útero después de administrar una vacuna atenuada del virus de la rabia. Así, De Pace fue la primera persona en atribuir el efecto antitumoral a la lisis generada por el virus. A partir de entonces numerosas remisiones tumorales se han descrito tras la infección con el virus de la hepatitis, del sarampión (del inglés, measles virus), de la rabia y de la varicela (Kelly and Russell, 2007). El interés generado por estas observaciones hizo que muchos virus fueran testados en diferentes modelos de tumor en roedores y en ensayos clínicos en humanos. Entre 1950 y 1980, se realizó el tratamiento de centenares de pacientes con cáncer terminal con diferentes virus tales como el adenovirus, el vaccinia, el paramixovirus, entre otros (Arakawa et al., 1987; Asada,

1974; Huebner et al., 1956; Kelly and Russell, 2007; Milton and Brown, 1966; Roenigk et al., 1974; Shimizu et al., 1988; Sinkovics and Horvath, 1993; Southam, 1960; Southam and Moore, 1951). Si bien la mayoría de los virus administrados presentaron algún grado de respuesta terapéutica (incluyendo remisiones completas), la variabilidad de la respuesta junto con la patogenicidad de los virus en tejidos normales hizo perder el interés por la viroterapia.

A partir de la década de los 90, los avances en la ingeniería genética y la biología molecular del cáncer permitieron descubrir los mecanismos de tropismo natural de diferentes virus. Así se describió, por ejemplo, que la selectividad tumoral del Reovirus dependía de la activación de la vía RAS y que el Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV) replicaba en células que presentaban un defecto en la vía del interferón (Coffey et al., 1998; Stojdl et al., 2000). También durante los años 90, gracias a los mejores conocimientos de las funciones de los genes virales, Frank McCormick propuso el adenovirus dl1520, para el tratamiento de tumores con la vía p53 alterada (Bischoff et al., 1996). En 1991, Martuza fue pionero en el diseño racional de virus condicionalmente replicativos mediante la modificación genética del Virus Herpes Simplex (HSV) (Martuza et al., 1991), para hacerlos condicionalmente replicativos. Desde entonces, el campo de la viroterapia ha renacido. Actualmente, diversos virus han sido modificados genéticamente para mejorar tanto la selectividad por la célula diana como la potencia antitumoral. Varios de ellos, como el vaccinia, el herpes, el adenovirus o el virus de sarampión han sido administrados en ensayos clínicos (Liu et al., 2007) e incluso uno de ellos, el adenovirus H101, ha sido aprobado y comercializado recientemente en China (Huang et al., 2009).

3. ADENOVIRUS ONCOLÍTICOS

En los años 50, el adenovirus fue identificado y poco tiempo después fue testado como agente oncolítico en un ensayo clínico para el tratamiento del cáncer cervical (Huebner et al., 1956). Las respuestas observadas fueron las mismas que con otros virus, es decir, respuestas antitumorales temporales y variables que no otorgaron una supervivencia mayor en los pacientes tratados (Kelly and Russell, 2007).

Los adenovirus presentan varias características que los hacen atractivos para su utilización dentro del campo de la oncoviroterapia. En primer lugar, son agentes de

baja patogenicidad. Segundo, son capaces de infectar tanto células en replicación como células en reposo, característica importante en tumores donde sólo entre el 5 al 20% de las células se encuentran en replicación en un momento determinado. Tercero, su replicación es capaz de provocar la lisis de la célula huésped. Cuarto, el genoma viral no se integra en el genoma de la célula huésped, evitando así el riesgo de recombinaciones o posibles mutaciones. Y finalmente, los adenovirus pueden amplificarse hasta obtener títulos virales altos, característica importante para su uso en ensayos clínicos (Alemany et al., 2000).

3.1 ESTRUCTURA DE ADENOVIRUS CANINO

Los adenovirus caninos (CAVs) se clasifican dentro del género *Mastadenovirus*, familia *Adenoviridae*. Dos serotipos de CAV han sido descritos en perros, CAV1 y CAV2. CAV1 es responsable de la hepatitis infecciosacanina, mientras que CAV2 sólo ocasiona una infección leve/moderada en el tracto respiratorio superior.

Cada virión está compuesto por una cápside icosaédrica, sin envuelta lipídica, que envuelve el núcleo de ADN genómico. La cápside de los CAVs, al igual que la de todos los adenovirus, está formada por 8 proteínas estructurales, entre ellas la proteína del hexón (Hx) que forma las 20 caras del icosaedro. La proteína de la base del pentón (Pb) forma los doce vértices del icosaedro, desde los cuales se proyecta a modo de antena la proteína de la fibra (Fig.3). La fibra está constituida por tres dominios: la cola del extremo N-terminal (*tail*), una región central o cuerpo de la fibra (*shaft*) y el dominio *Knob*, que corresponde al extremo C-terminal, responsable de la interacción del virus con el receptor CAR (del inglés *Coxsackie and Adenovirus Receptor*) (Schoehn et al., 2008). El núcleo del virión está compuesto por un ADN linear de doble cadena, de 31.3 Kb (Klonjowski et al., 1997).

3.2 BIOLOGÍA DE LOS ADENOVIRUS

Los adenovirus son virus con un ciclo lítico. La entrada del adenovirus canino a la célula huésped tiene lugar mediante el reconocimiento y la interacción del dominio *Knob* de la fibra con el receptor celular de alta afinidad CAR. Sin embargo, los adenovirus caninos no presentan un dominio RGD (Arg-Gly-Asp) en la proteína de la base del pentón, que en la mayoría de los adenovirus humanos (hAd) media

una interacción con las integrinas que permite la internalización del virus mediante la formación de vesículas de clatrina. Esto sugiere la presencia de otros receptores auxiliares o mecanismos de internalización diferentes a los comúnmente conocidos para el hAd 2 y 5 (Chillon and Kremer, 2001; Hay, 2003; Seiradake et al., 2009; Soudais et al., 2000).

En la actualidad no existe información detallada acerca de la expresión de genes durante el ciclo biológico del CAV, aunque su similitud con los adenovirus humanos (hAd) sugiere un ciclo biológico similar. La transcripción en los hAd ocurre en dos fases: la temprana (*early*) y la tardía (*late*) (Fig. 3). Durante la fase temprana la célula huésped se convierte en una productora eficiente del genoma viral. Debido a que la mayoría de las células huésped se encuentran en un estado quiescente en el momento de la infección, las proteínas virales deben interactuar con las proteínas de la célula huésped para activar la replicación y la división celular. El primer gen que se transcribe a nivel del genoma viral es E1A y su producto se une a diferentes proteínas celulares como pRB, p107 y p130. Esta interacción impide que estas proteínas celulares se unan al factor de transcripción E2F y lo bloqueen. De esta manera se activa el ciclo celular y comienza la replicación del ADN viral. Sin embargo, la desregulación del ciclo celular provocada por E1A induce la acumulación del gen supresor tumoral p53. La activación de la vía p53 puede resultar en la inducción de la apoptosis, previniendo así la supervivencia de la célula dañada. La expresión del producto del gen adenoviral E1B impide la muerte prematura de la célula huésped. La proteína E1B-55kD se une a p53 e induce su degradación, mientras la proteína E1B-19kD presenta funciones similares a las del factor antiapoptótico Bcl2. A través de estos mecanismos antiapoptóticos el virus mantiene la célula viva el máximo de tiempo posible para maximizar la producción viral. Los productos sintetizados a partir de la transcripción de la región E3 inhiben la respuesta inmunitaria antiviral, permitiendo así la permanencia de la célula huésped infectada. Finalmente, la unidad transcripcional E4 codifica para proteínas involucradas en el transporte de ARN viral y el control del ciclo celular. La expresión de los genes tempranos E2 conducen a la replicación del ADN viral. Una vez que el ADN se ha replicado, se activa el promotor principal tardío (del inglés *Major Late Promoter-MLP*), que conduce a la expresión de un transcrito de ARNm que, por corte y ligación diferencial, genera todos los ARN que codifican para las proteínas estructurales que forman la cápside. Finalmente, ocurre la encapsidación del *core* y la formación de nuevos viriones, que salen de la célula huésped induciendo consecuentemente la muerte celular.

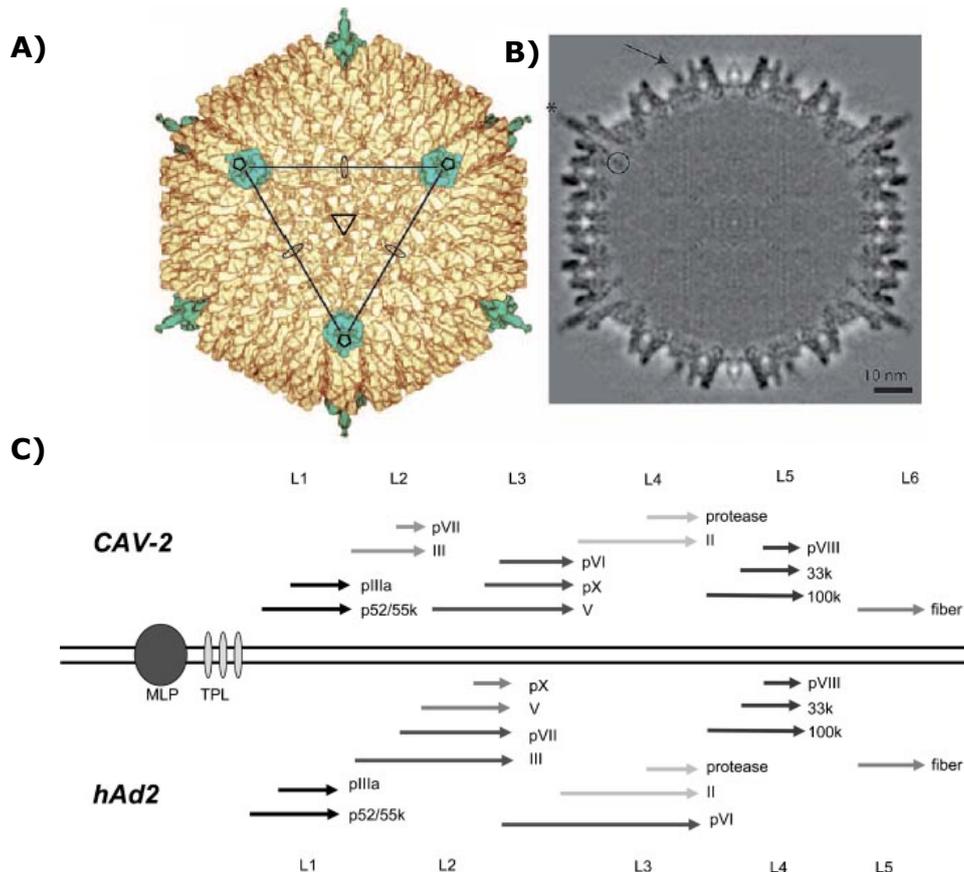


Figura 3. Estructura y organización genómica de adenovirus canino tipo 2. (A) Estructura en 3D del virión a una resolución de 12-Å. La proteína del pentón se muestra en color verde y el resto de la cápside en color amarillo. La línea continua conecta tres puntos del pentón delimitando una de las 20 caras de la cápside (Schoehn et al., 2008). (B) Corte transversal del CAV2 mediante microscopía electrónica en una escala de 10 nm (Schoehn et al., 2008). (C) Organización transcripcional de las unidades de transcripción tardías del adenovirus canino 2. Las unidades de transcripción tardías del CAV2 y del adenovirus humano 2, representante prototipo del género *Mastadenovirus*, se muestran arriba y abajo del genoma del adenovirus (doble línea) (Szelechowski et al., 2009).

3.3 SELECTIVIDAD TUMORAL DE ADENOVIRUS ONCOLÍTICOS

A diferencia de otros virus, como el Reovirus o el Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV), el Adenovirus no presenta selectividad natural por las células tumorales. Con el propósito de conferir a los adenovirus una selectividad hacia la célula tumoral se pueden utilizar tres estrategias. Una es la delección de funciones virales que son necesarias para la replicación en células normales, pero no para la replicación en células tumorales. Otra estrategia, es el control de los genes virales que inician la replicación mediante promotores exclusivos de tumor. Por último, la modificación de las proteínas de la cápside viral implicadas en la infección de la célula huésped.

3.3.1 Deleciones de genes virales que otorgan selectividad tumoral

Los adenovirus requieren de la maquinaria de la célula huésped para la replicación de su genoma. Mutaciones o deleciones en los genes virales involucrados en la activación de la replicación celular generan virus de replicación selectiva en las células tumorales, pero no en las células normales. En las células tumorales, donde la replicación celular se encuentra activada y la vía de la apoptosis se encuentra inhibida, el virus es capaz de replicarse y consecuentemente de provocar la lisis de la célula tumoral (Chu et al., 2004).

El primer gen viral que fue delecionado para conseguir replicación selectiva fue E1B. La deleción de una región del gen que codifica para la proteína E1B-55k dio origen al adenovirus dl1520 (también llamado ONYX-015 y CI-1042). Con esta mutación, el dl1520 era capaz de replicarse sólo en células con la proteína p53 inactivada, como ocurre en las células tumorales (Bischoff et al., 1996). Posteriormente, deleciones en la región conservada 2 de E1A generó nuevos virus de replicación selectiva, como el Ad Δ 24 ó AddI922-947 (Fueyo et al., 2000). Las deleciones en esta región otorgan selectividad en células con alteraciones en la vía de pRb. Otra deleción utilizada para otorgar selectividad a los adenovirus, es la deleción de los genes VA (Cascallo et al., 2003; Cascallo et al., 2006), que dependen de la activación de la vía RAS o del truncamiento de la vía del interferón, alteraciones que se presentan comúnmente en las células tumorales (Granden, 1998).

Utilizando esta estrategia para conferir selectividad a los adenovirus, sólo el Ad Δ 24 ha sido probado en el contexto del osteosarcoma. La infección de líneas celulares humanas de osteosarcoma, de cultivos celulares primarios y de tumores xenoinjertados de osteosarcoma con el Ad Δ 24 mostró una baja eficacia a dosis bajas. Sin embargo, cuando el tropismo del Ad Δ 24 fue expandido hacia las integrinas, utilizando la inserción del motivo RGD (Ad5- Δ 24RGD) en la fibra, la potencia antitumoral *in vitro* aumentó eficientemente. Además, la inyección intratumoral del Ad5- Δ 24RGD en un modelo humano xenoinjertado de osteosarcoma derivado directamente de pacientes con osteosarcoma mostró una significativa disminución del crecimiento tumoral (Liebau et al., 2004). Sin embargo, en el entorno de CAV2 no se han realizado modificaciones utilizando esta estrategia.

3.3.2 Control de la replicación viral mediante el uso de promotores específicos de tumor

3.3.2.1 Direccionamiento transcripcional

Otra estrategia para conferir selectividad a los adenovirus hacia la célula tumoral es a través de la regulación de la expresión de genes virales –como por ejemplo E1A- mediante la inserción de promotores específicos de tejidos o de célula tumoral (Tabla 2). Para aumentar la selectividad hacia tejidos se han utilizado diferentes promotores, como por ejemplo el del antígeno específico de próstata (PSA) para el cáncer de próstata (Rodriguez et al., 1997), el de la α -fetoproteína (AFP) para el hepatocarcinoma (Hallenbeck et al., 1999) o el de la osteocalcina (OC) para el osteosarcoma o cáncer de próstata (Hsieh et al., 2002; Matsubara et al., 2001). Otra estrategia dentro del direccionamiento transcripcional, es la inserción de promotores específicos de tumor, los cuales se encuentran activados en varios tipos tumorales, permitiendo así el tratamiento de un rango más amplio de tumores. Dentro de esta línea, se ha utilizado el promotor de E2F (Cascallo et al., 2007; Johnson et al., 2002; Majem et al., 2006; Ryan et al., 2004), el promotor COX-2 (Nettelbeck et al., 2003) o el promotor de la telomerasa humana (hTERT) (Fujiwara et al., 2007), entre otros. El promotor hTERT es un fuerte candidato para direccionar la selectividad viral hacia la célula de osteosarcoma, tanto en humanos como en perros, debido a la alta expresión de telomerasa que se observa en tumores de OSA en ambas especies (Kow et al., 2008; Sanders et al., 2004).

3.3.2.2 Promotor de osteocalcina.

La osteocalcina (OC) es una proteína no colágeno de la matriz ósea producida por los osteoblastos, cuyo pico de expresión se encuentra restringida en neonatos. En adultos, su expresión se observa sólo en tumores osteotrópicos, como lo es el osteosarcoma y el adenocarcinoma de próstata (Ko et al., 1996; Li et al., 2006).

La inserción del promotor de OC para controlar la expresión de E1A dentro del entorno de un hAd ha dado origen al Ad-OC-E1A u OCaP1. La significativa efectividad antitumoral del OCaP1 observada en un modelo murino hizo que en el año 2001 se estudiara la administración sistémica del OCaP1 en un fase I/II en pacientes con OSA metastático pulmonar refractario al tratamiento con quimioterapia. En el ensayo clínico se determinó la seguridad de su administración,

así como también la moderada respuesta terapéutica en los pacientes que fueron inyectados (Benjamin et al., 2001; Li et al., 2006). La caracterización de la actividad del promotor de osteocalcina también ha sido estudiada dentro del entorno de CAV2 (OCCA), tanto en líneas celulares como en cultivos primarios caninos (Hemminki et al., 2003) (ver apartado 3.4).

Tabla 2. Direccionamiento transcripcional: Resumen de algunos adenovirus oncolíticos con genes tempranos controlados por promotores específicos

Virus	Tumor	Promotor	Gen Controlado	Especificidad	Ensayos clínicos	Referencias
Adv-TERTp-E1a	Pan	TERT	E1A	TERT +	No	(Huang et al., 2003)
TEhRt-Ad		TERT	E1A	TERT +	No	(Wirth et al., 2003)
HyPR-Ad		HIF	E1A	HIF + o hipoxia	No	(Post et al., 2007)
Ad9xHRE1A		HIF	E1A	HIF + o hipoxia	No	(Cuevas et al., 2003)
Ar6pAE2fE3F		E2F-1	E1A	Células en replicación + inactivación pRb	No	(Jakubczak et al., 2003)
ONYX-411		E2F-1	E4, E1AΔCR2	Células en replicación + inactivación pRb	No	(Johnson et al., 2002)
AdE2F-1 ^{RC}		E2F-1	E1A	Células en replicación + inactivación pRb	No	(Tsukuda et al., 2002)
AdE3-cox2-327		Ciclooxigenasa 2	E1A	Cox-2 +	No	(Shirakawa et al., 2004)
AdEHT2	mama	a) Estrógen + hipoxia b) TERT	a) E1A b) E4	Receptor de estrógeno	No	(Hernandez-Alcoceba et al., 2002)
AdEHE2F		a)Estrógeno + hipoxia b)E2F-1	a) E1A b) E4	Receptor de estrógeno	No	(Hernandez-Alcoceba et al., 2002)
Ad.ERE2		Promotor pS2 Respuesta a estrógenos	E1A, E4	Receptor de estrógeno	No	(Hernandez-Alcoceba et al., 2000)
Ad-OC-E1A	Próstata	Osteocalcina murina	E1A	Osteocalcina +	No	(Matsubara et al., 2001)
CV787	Próstata	a)Probasina de rata b)PSA	a) E1A b) E1B	PSA+	Fase I	(Yu et al., 1999)
CV764	Próstata	a) PSA b) Caliceína glandular	a) E1A b) E1B	PSA+	No	(Yu et al., 1999)
CN706	Próstata	Promotor PSA	E1A	PSA+	Fase I	(Rodríguez et al., 1997)
AvE1a04i	Hígado	α - Fetoproteína	E1A	AFP +	No	(Hallenbeck et al., 1999)
CV890	Hígado	α - Fetoproteína	E1A-IRES-E1B	AFP +	No	(Li et al., 2001)
AdTyrwt	Melanoma	'Enhancer' Tirosinasa	E1A	Tirosinasa +	No	(Nettelbeck et al., 2002)
AdTyrΔ24	Melanoma	'Enhancer' Tirosinasa	E1AΔ24 (CR2)	Tirosinasa + inactivación pRb	No	(Nettelbeck et al., 2002)
vCF11	Colon	Responde a sitios Tcf	E1A	Via Wnt activada	No	(Fuierer and Iggo, 2002)
AdMKE1	Neuroblastoma	Midquina	E1A	Midquina +	No	(Adachi et al., 2001)

3.3.3 Direccionamiento de la infectividad viral: Direccionamiento transduccional

Otra estrategia para direccionar al adenovirus hacia la célula tumoral consiste en modificar su cápside para modular su tropismo hacia la célula del tumor. Este diseño de direccionamiento transduccional es importante cuando el objetivo es la administración sistémica para el tratamiento de la enfermedad metastásica. El tropismo preferencial por las células tumorales requiere el bloqueo de la unión del virus con sus receptores naturales o *detargeting*. Mientras que el redireccionamiento del adenovirus hacia la célula tumoral diana necesita de un ligando específico de tumor o *retargeting*.

Una aproximación para aumentar la infectividad tumoral es la inserción del motivo RGD en el HI-*loop* del *Knob* de la fibra adenoviral para permitir la entrada del virus a la célula tumoral mediante la interacción con las integrinas, ya que el receptor CAR –que media la entrada a la célula– se encuentra poco expresado en células tumorales (Bauerschmitz et al., 2002). Otro diseño para aumentar la infectividad tumoral es la construcción de fibras adenovirales quiméricas que contienen, por ejemplo, el *shaft* de la fibra del hAd5 y el *knob* de la fibra del CAV1 ó CAV2 (Paul et al., 2008; Zheng et al., 2007).

3.4 OCCAV

El OCCAV (del inglés *Osteocalcin promoter Controlled Canine AdenoVirus*) es el primer adenovirus oncolítico no humano de replicación selectiva construido, que ha sido diseñado para el tratamiento del osteosarcoma canino. Para inhibir la replicación de OCCAV en células normales caninas, la selectividad tumoral hacia células de osteosarcoma se obtuvo a través de la inserción de un promotor específico de osteocalcina que controla la expresión del gen E1A (Fig. 4) (Hemminki et al., 2003).

La caracterización del perfil de potencia y toxicidad de OCCAV indicaron que mientras el adenovirus canino salvaje (CAV2) era capaz de replicarse *in vitro* tanto en células tumorales de osteosarcoma caninas como en células no tumorales caninas y murinas, la replicación de OCCAV estaba confinada a células tumorales de osteosarcoma y que su capacidad de replicarse y lisar las células tumorales cultivadas *in vitro* era similar a la de CAV2. Durante la administración intratumoral

de OCCAV en ratones atímicos con tumores xenoinjertados de osteosarcoma canino, se pudo observar que el virus era capaz de inducir una inhibición del crecimiento tumoral significativa respecto al grupo control no tratado (Hemminki et al., 2003).

El estudio de toxicidad realizado en perros sanos indicó que la administración sistémica de 2×10^{12} partículas virales (vp) de OCCAV no generaba ningún cambio patológico en los parámetros evaluados: anafilaxis, cambios hematológicos, toxicidad en órganos (cambios histopatológicos) y replicación viral fuera del órgano diana; también se comprobó que la inmunosupresión inducida con ciclofosfamida (50 mg/m^2) no aumentaba la toxicidad de la administración sistémica de OCCAV. La detección de ADN viral en orina, heces, sangre y plasma también fue cuantificada. Durante las 48 horas posteriores a la administración de OCCAV fue posible detectar ADN viral en sangre y plasma. En orina y heces, la presencia de ADN viral durante 96 horas posteriores a la inyección sugirieron la potencial necesidad de aislamiento de los animales tratados; sin embargo, la presencia de genomas virales no es indicativa de presencia de partículas virales funcionales, por lo que más estudios deben realizarse para determinar el tiempo de aislamiento necesario después de la administración de adenovirus canino condicionalmente replicativo (Smith et al., 2006).



Figura 4. Mecanismo de selectividad de OCCAV. La inserción del promotor específico de osteocalcina que controla la expresión de E1A del adenovirus canino tipo 2 restringe la replicación del virus a células que tengan una expresión de osteocalcina como lo son las células de tumores osteotrópicos y no en células normales.

3.5 BARRERAS PARA EL TRANSPORTE DE VIRUS ONCOLÍTICOS

La mayoría de los ensayos clínicos realizados en humanos con virus oncolíticos (OV) utilizan la administración intratumoral como una manera de maximizar el transporte viral a la célula tumoral (Liu et al., 2007). Diferentes adenovirus oncolíticos, principalmente ONYX-015, pero también otros virus de replicación controlada por promotores tumorales (CV706 y CV890), han sido administrados intratumoralmente en humanos en diferentes ensayos clínicos. Sin embargo, a pesar de la escasa toxicidad observada después de su administración, la baja eficacia antitumoral mostrada en estos ensayos clínicos se puede atribuir a

diferentes factores: la ineficiencia del virus para distribuirse homogéneamente a través de la masa tumoral, la elevada presión intersticial intratumoral y la presencia de matriz extracelular en el tejido tumoral y el tejido fibrótico.

La administración sistémica de los virus oncolíticos asegura el transporte de la terapia a la enfermedad metastásica, o bien, a sitios tumorales inaccesibles para una administración regional. Sin embargo, la administración por vía sistémica también limita la eficacia antitumoral de los adenovirus replicativos (Fig. 5). Los adenovirus, que en la naturaleza no entran al organismo por vía sistémica, son rápidamente eliminados del torrente circulatorio por las células del hígado, limitando mucho la cantidad de virus que llega al tumor (Worgall et al., 1997). Además, los adenovirus inyectados directamente al torrente sanguíneo son vulnerables a ser inactivados por las proteínas del complemento, capturados por el sistema retículo endotelial, unidos a los eritrocitos y neutralizados por los anticuerpos preformados (Ilett et al., 2009; Power and Bell, 2007). De éstos, los anticuerpos anti-adenovirus son probablemente la barrera más restrictiva para la terapia, ya que generan una inmunidad prolongada en el tiempo que impide una administración repetida del vector.

En modelos animales *naive*, la administración sistémica de adenovirus induce una respuesta inflamatoria aguda en el hígado por inducción de citoquinas y quimoquinas pro-inflamatorias, que provoca una infiltración leucocitaria y consecuentemente necrosis y daño tisular (Muruve et al., 2008; Schnell et al., 2001). El adenovirus induce una toxicidad aguda que es dosis dependiente y, al mismo tiempo, independiente de la expresión de genes virales, ya que son las proteínas de la cápside viral las responsables de la respuesta inmune innata (Muruve et al., 1999). La respuesta inmune innata provoca el daño tisular que culmina en la eliminación de las células transducidas y, consecuentemente en la reducción del nivel y duración de la expresión de proteínas virales. Además, los adenovirus también se unen a proteínas séricas (factores del complemento, factores de la coagulación, inmunoglobulinas inespecíficas) a través de receptores, como los receptores del complemento o receptores Fc, en células inmunes y la activación de estos receptores innatos (tales como TLR9 y NALP3) pueden activar una respuesta inflamatoria por interferón e interleuquinas (Muruve et al., 2008; Zhu et al., 2007).

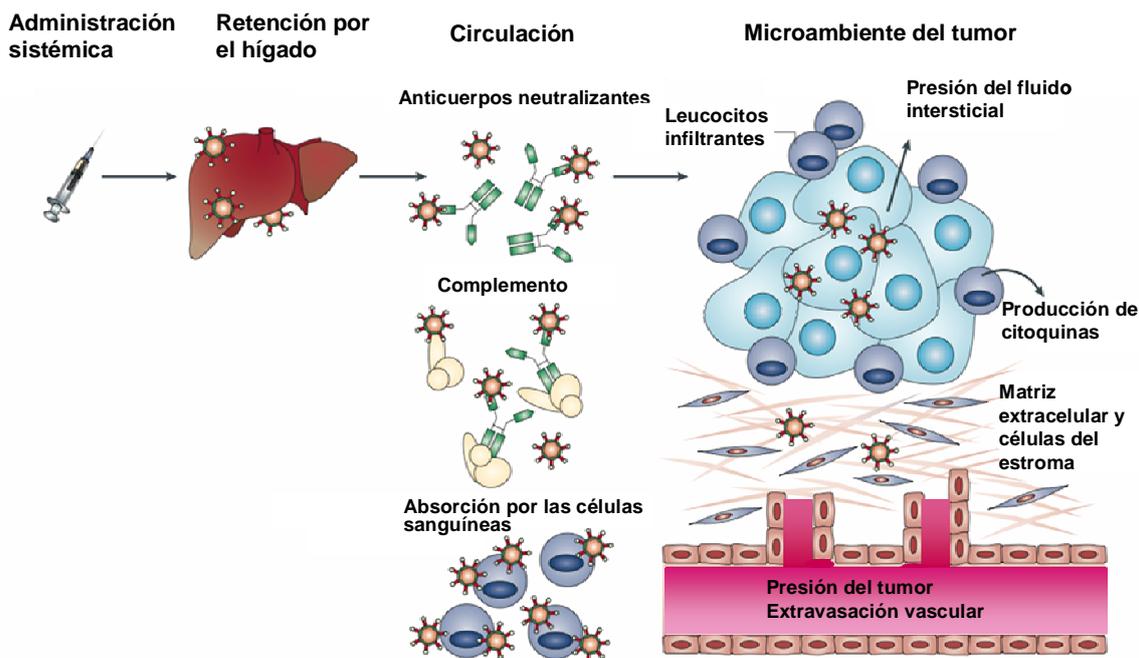


Figura 5. Barreras que dificultan la distribución de adenovirus oncolíticos en los tumores *in vivo*. Después de la administración sistémica de un adenovirus en un paciente, existen diferentes barreras que evitan que el virus llegue al tumor e infecte las células tumorales. Durante los primeros minutos, la mayoría del virus administrado es retenido por el hígado. El poco virus que escapa de éste órgano pasa a la circulación sistémica, donde puede ser neutralizado por absorción en las células sanguíneas, por la cascada del complemento o por los anticuerpos neutralizantes. Para que el virus acceda al tumor debe salir del torrente sanguíneo atravesando la pared del endotelio en contra del gradiente de presión presente en el fluido intersticial. Una vez en el tumor, la dispersión del virus puede verse perjudicada por la presencia de la matriz extracelular y las células del estroma. Finalmente, los leucocitos infiltrantes del tumor pueden limitar la dispersión del virus célula a célula mediante su actividad antiviral o de forma indirecta mediante la secreción de interferones y otras citoquinas (Parato et al., 2005).

La respuesta inmune innata también inicia y modula la respuesta adaptativa. La interacción del adenovirus con las células presentadoras de antígenos estimula la respuesta adaptativa, incluyendo la respuesta de las células T citotóxicas hacia las proteínas de la cápside viral (Yang et al., 1995). El adenovirus una vez ingresa al organismo es transportado por los macrófagos a los linfonodos, mientras las células B inician la producción de los anticuerpos contra las proteínas de la cápside del adenovirus (Junt et al., 2007). Simultáneamente, las células de memoria T CD8+ reconocen las células que expresan antígenos adenovirales eliminándolas rápidamente, mientras los anticuerpos neutralizantes previenen la transducción del

virus y las células T de memoria reducen la expresión y destruyen a las células transducidas.

3.5.1 Anticuerpos neutralizantes

Más del 90% de la población humana presenta anticuerpos contra varios serotipos de hAd debido a las repetidas exposiciones naturales al virus a lo largo de su vida; además, durante casi la mitad del tiempo poseen anticuerpos neutralizantes que pueden, en una administración sistémica del adenovirus oncolítico, prevenir o significativamente disminuir el valor terapéutico del virus (Bangari and Mittal, 2006; Chirmule et al., 1999; Tsai et al., 2004). Se ha observado que después de la primera exposición a un vector adenoviral, o bien se desarrollan, o bien aumentan, los títulos de anticuerpos neutralizantes anti-adenovirus presentes antes de la administración del vector (Juillard et al., 1995). La población canina también presenta anticuerpos neutralizantes anti-CAV, ya sea producto de una infección natural o como resultado de una inmunización. A nivel mundial, los perros son inmunizados con una vacuna viva basada en el serotipo 2 para proteger contra ambos serotipos de adenovirus. Por lo tanto, en este contexto la población canina se asemeja a la población humana que presenta una inmunidad generalizada contra los hAd 2 y 5.

La rápida estimulación del sistema inmune después de la administración de vectores adenovirales se debe a la inmunogenicidad de las proteínas de la cápside viral. En el hombre, las proteínas más inmunogénicas son la proteína de la fibra y de la base del pentón, aunque en menor extensión también lo es la proteína del hexón. La mayor inmunogenicidad de la proteína de la base del pentón y de la fibra se puede explicar por la mayor exposición de la superficie de ambas proteínas al sistema inmune, después de la pérdida de la fibra presente en los viriones en el momento de la unión del adenovirus con la célula (Gahery-Segard et al., 1998; Hong et al., 2003; Molinier-Frenkel et al., 2002). Sin embargo, la inmunogenicidad de las proteínas de la cápside no es equivalente en todas las especies, ya que en ratones la repuesta inmune neutralizante se genera principalmente en contra de la proteína del hexón (Wohlfart, 1988).

Los datos obtenidos en estudios en animales inmunizados y en ensayos clínicos sugieren que la presencia de anticuerpos anti-adenovirus determina una reducción en la transducción y expresión de transgenes en la célula diana. La reducción de la expresión de transgenes probablemente se debe a la respuesta de

las células T de memoria que rápidamente eliminan las células que expresan las proteínas de la cápside adenoviral. La inmunidad preexistente también aumenta la toxicidad e incluso la mortalidad en modelos murinos y en primates no humanos (Varnavski et al., 2005; Varnavski et al., 2002; Vlachaki et al., 2002). El aumento de la respuesta inmune puede ser debida a la mayor captación por parte de las células inmunes innatas; éstas pueden captar al virus opsonizado vía receptor-FC. La mayor captación resulta en un aumento de la exposición de los receptores intracelulares innatos, tales como NALP3 o TLR al virus, induciendo la expresión de genes inflamatorios (Muruve et al., 2008; Zaiss et al., 2009b). Considerando la mayor toxicidad y la menor eficacia del vector en animales inmunocompetentes, es necesario evadir los anticuerpos neutralizantes si se quiere desarrollar terapias sistémicas adenovirales.

Numerosas investigaciones han buscado proteger a la partícula viral dentro de la circulación sanguínea de la neutralización por parte de los anticuerpos. Tratamientos en el propio virus como la PEGilación (Lanciotti et al., 2003) o la encapsulación con liposomas (Steel et al., 2004), o tratamientos en el modelo animal o pacientes con inmunosupresión o inmunomodulación con ciclosporina, ciclofosfamida (Bouvet et al., 1998; Jooss et al., 1996; Smith et al., 1996) o etopósido (Bouvet et al., 1998), han permitido una recuperación parcial de la infección a la célula diana en una segunda o tercera administración de la terapia, pero estas modificaciones han sido inefectivas en administraciones sucesivas de los adenovirus. Recientemente, la utilización de células como transportadoras de virus ha abierto un nuevo camino para evadir la neutralización por parte de los anticuerpos neutralizantes.

4. CÉLULAS TRANSPORTADORAS: VEHÍCULOS PARA EL TRANSPORTE SISTÉMICO DE VIRUS ONCOLÍTICOS.

La utilización de células como vehículos transportadores (en inglés *carrier cells*) es una nueva aproximación para el transporte sistémico de los virus oncolíticos que previene su eliminación o neutralización sistémica. El sistema de transporte mediado por células puede transportar la carga viral a la célula diana a través de la adhesión del virus a la superficie de la célula o bien actuar como fábricas amplificadoras de virus mientras transportan el virus al tumor (caballos de Troya). Se han utilizado diferentes tipos de células como transportadoras de virus oncolíticos, tales como células tumorales, células T, monocitos, células dendríticas,

células endoteliales, células mesenquimales y células progenitoras de la médula ósea.

Las potenciales ventajas que tienen las células como vehículos de transporte sistémico son en primer lugar la capacidad que tienen ciertas células de llegar al tejido neoplásico diana. En segundo lugar, las células transportadoras pueden expresar transgenes que excedan la capacidad de clonaje del vector viral utilizado y, así, reforzar la actividad de los virus oncolíticos. En tercer lugar, pueden actuar como fábricas amplificadoras del virus inicialmente inoculado. Finalmente, los virus oncolíticos resguardados por las células transportadoras quedan protegidos de la inactivación por el sistema inmune hasta su liberación en el tejido diana.

4.1 Fases del transporte mediado por células

Las tres fases secuenciales del transporte de la carga viral mediante células son la infección *in vitro* de la célula transportadora, el transporte hacia el tumor a través de la circulación sanguínea y la liberación de la progenie viral en el tumor. La utilización de este sistema bioterapéutico de transporte mediado por células es altamente dependiente de la cinética de la replicación del virus, del transporte *in vivo* y de la producción viral en la célula transportadora. La coordinación de estos tres factores con el factor tiempo es esencial para obtener un transporte efectivo del virus capaz de evadir al sistema inmunitario (Fig. 6).

4.1.1 Fase I: Infección in vitro

El objetivo de esta fase es infectar la mayor cantidad de células en un corto período de tiempo. A una mayor cantidad de células infectadas se producirá una mayor amplificación de la dosis oncolítica potencial e inicialmente administrada. El tiempo de infección debe estar ajustado a la cinética del virus, ya que se debe evitar la expresión de antígenos virales en la superficie celular que desencadenaría su destrucción durante la fase del transporte sistémico por las proteínas del complemento, por fagocitosis o por células citotóxicas y, por lo tanto, no se alcanzaría el objetivo de la evasión inmunológica y transporte a la célula tumoral.

4.1.2 Fase II: Transporte sistémico

Esta fase involucra el transporte de virus oncolíticos, escondidos dentro de las células, a través de la circulación y su llegada al tumor. Al igual que en la primera fase, el tiempo es un determinante crucial para el éxito del transporte, ya que se requiere que la célula infectada llegue a la célula tumoral antes que se expresen los antígenos virales en su superficie celular y antes de que la progenie viral sea liberada.

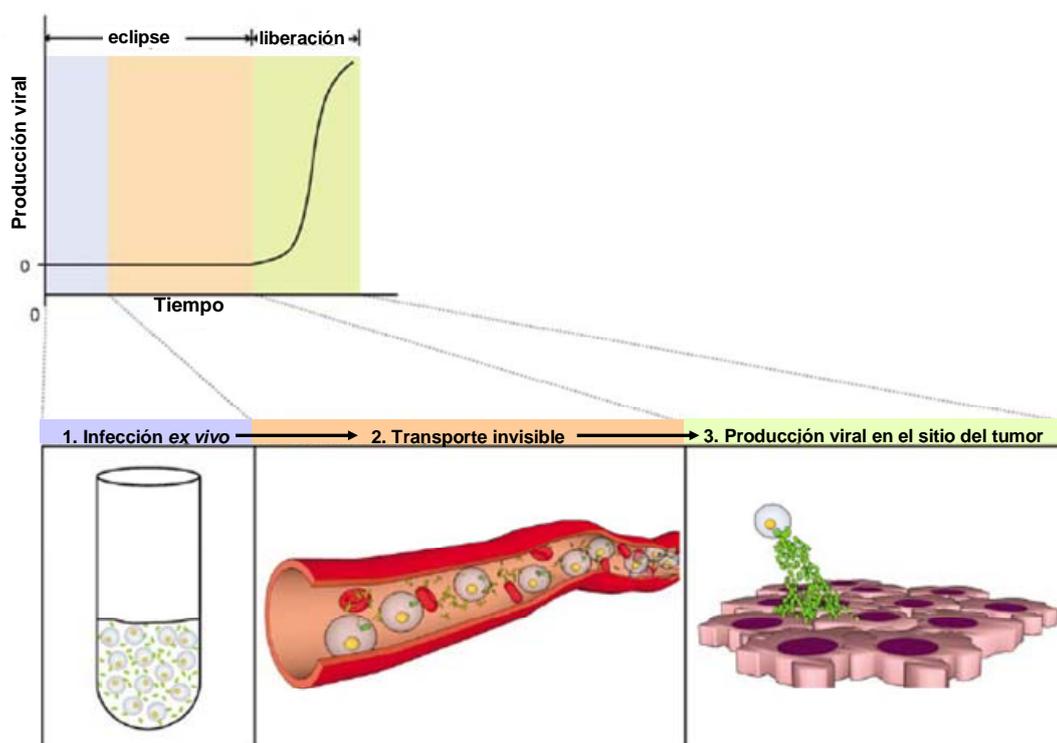


Figura 6. Fases secuenciales en el transporte mediado por células de virus oncolíticos. La infección *in vitro* de las células transportadoras y su posterior administración por vía sistémica es capaz de escapar de las defensas antivirales y alcanzar el tumor durante la fase de eclipse (antes de la síntesis de las proteínas virales y liberación de los viriones) y posteriormente liberar la progenie viral para infectar las células tumorales. La administración de células cargadas con virus oncolíticos requiere de una coordinación de las tres fases -infección *ex vivo*, transporte y producción viral en el sitio tumoral- con el ciclo biológico de virus oncolítico (Power and Bell, 2008).

Diferentes tipos celulares han sido demostrados como transportadores eficaces de vectores virales al tumor (Cole et al., 2005; Iankov et al., 2007; Ilett et al., 2009; Ong et al., 2007; Power et al., 2007; Qiao et al., 2008a; Qiao et al., 2008b; Thorne et al., 2006) y su tropismo tumoral está determinado a diferentes niveles: 1) A la célula tumoral directamente; 2) A las características biológicas asociadas con el tumor y 3) A la localización anatómica del tumor (Fig. 7; Tabla 3).

4.1.2.1 Selectividad asociada a célula tumoral

Existen células transportadoras que tienen especificidad por células tumorales *per se*. Un ejemplo, es el reconocimiento de los antígenos tumorales por las células T antígeno-específicas. En estos casos, las células transportadoras (células T) pueden atravesar las barreras endoteliales hacia el tumor penetrando a través de cualquier estroma asociado a tumor y accediendo directamente a la célula tumoral (Fig. 7).

4.1.2.2 Selectividad asociada a las características biológicas del tumor.

Muchas células transportadoras no reconocen a la célula tumoral *per se*, sino que al microambiente creado por él. Un ejemplo es la llegada de macrófagos por la hipoxia asociada al tumor, el tráfico de células mesenquimales a áreas de producción de citoquinas asociadas a tumor o el reclutamiento de células endoteliales por la angiogénesis asociada a tumor. En estos casos, las células transportadoras depositan los virus dentro del tumor y éstos deben ser capaces de recorrer la corta distancia que los separa de las células tumorales diana para provocar una infección productiva (Fig. 7).

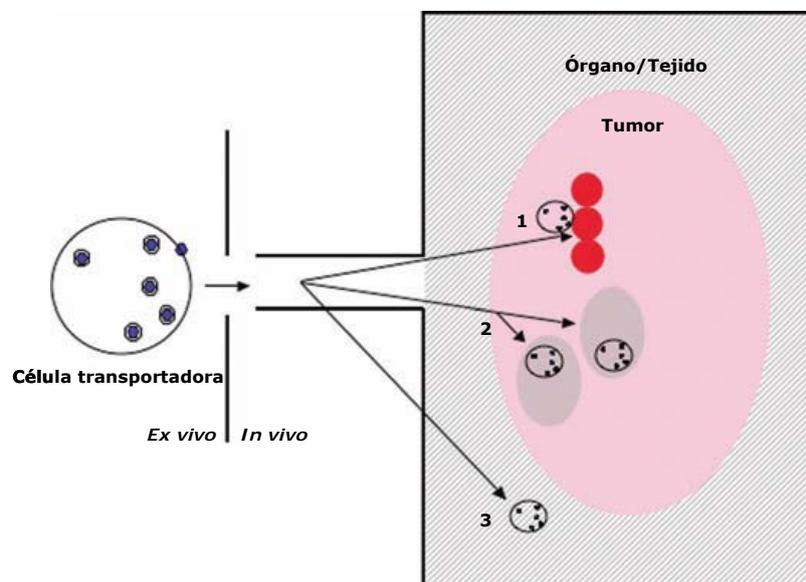


Figura 7. Niveles de dianas tumorales por las células transportadoras. La llegada de la célula transportadora al sitio diana se asocia a 3 mecanismos principales: 1) Selectividad directa a la célula tumoral; 2) Selectividad asociada a características del tumor y 3) Selectividad a la localización del tumor (Willmon et al., 2009)

4.1.2.3 Selectividad asociada a la localización anatómica del tumor.

Hay células transportadoras que no presentan especificidad asociada al tumor, pero tienen demostrada una ruta intrínseca hacia órganos o tejidos específicos. Si el tumor se localiza en un lugar anatómico concreto, las células transportadoras pueden ser usadas para liberar el virus dentro de territorios en los cuales encontrarán al tumor. Un ejemplo es el uso de células T u otras células inmunes las cuales naturalmente van a órganos linfoides (Fig. 7).

Tabla 3. Ejemplos de vehículos celulares para el transporte sistémico de vectores virales

Tipo de Células Transportadoras	Referencia
Diana a célula tumoral <i>per se</i>	
Células T	(Cole et al., 2005; Harrington et al., 2002; Ilett et al., 2009; Ong et al., 2007; Power et al., 2007)
CIK cells (Cytokine-induced killer cells)	(Power and Bell, 2008)
Diana a características asociadas a tumor	
Macrófagos asociados a tumor	(Pfirschke and Schirrmacher, 2009)
Células progenitoras endoteliales	(Power and Bell, 2008)
Células madres mesenquimales	(Jevremovic et al., 2004; Sica et al., 2006)
Diana a localización anatómica del tumor	
Linfocitos	(Ong et al., 2007; Smith-Franklin et al., 2002)
Células dendríticas	(Smith-Franklin et al., 2002)
Líneas celulares tumorales	(Coukos et al., 1999; Garcia-Castro et al., 2005; Hamada et al., 2007; Kottke et al., 2008)

4.1.3 Fase III: Producción viral en el tumor

Esta fase involucra la liberación de la progenie viral transportada dentro del vehículo celular en el sitio del tumor. Dependiendo de la combinación célula transportadora-virus oncolítico utilizada, cada célula infectada será capaz de liberar una cantidad determinada de virus. Esta habilidad ofrece la potencial amplificación de la dosis de virus inicialmente inoculada *in vitro*, es decir, si la célula escogida como transportadora es capaz de producir grandes cantidades de virus una vez alcanzado el tejido diana el rol de la célula infectada pasa de ser un vehículo de transporte a ser *in situ* una fábrica productora de virus oncolíticos (Fig. 6).

4.2 Células tumorales como transportadoras de virus oncolíticos.

El uso de células tumorales tiene ventajas que las hacen ser buenas candidatas como transportadoras. Dentro de estas ventajas se encuentran que son permisivas a la multiplicación de los virus oncolíticos y que permiten una eficiente amplificación de la producción de la progenie viral sostenida en el tiempo.

Las células tumorales utilizadas para el transporte pueden ser autólogas, alogénicas o xenogénicas. El uso de células autólogas minimiza la posibilidad de rechazo por incompatibilidades, lo que extiende el tiempo disponible para la liberación de la progenie viral. Además el uso de células autólogas infectadas irradiadas constituye una genuina vacuna antitumoral, que puede actuar como adyuvante de la viroterapia. La principal ventaja que otorga el uso de células alogénicas es que son por sí mismas inmunogénicas, lo que produce una activación de las células CD4+ y CD8+ en el sitio de llegada, creando de esta manera un microambiente local que favorece la activación de los linfocitos T citotóxicos (CTL) antitumorales en el tumor.

Una desventaja del sistema celular transportador compuesto de células heterólogas es que si bien tanto las líneas celulares alogénicas como las xenogénicas han demostrado ser igualmente capaces de transportar los virus oncolíticos al tumor, la cinética de eliminación por histocompatibilidades es más rápida en las células xenogénicas que en las alogénicas, debido a la mayor rapidez de activación de los mecanismos inmunológicos tales como los anticuerpos y proteínas del complemento.

Estudios preclínicos previos utilizando células tumorales han demostrado el transporte viral efectivo al tejido tumoral y su subsecuente infección (Tabla 4) (Coukos et al., 1999; Garcia-Castro et al., 2005; Hamada et al., 2007; Ilett et al., 2009; Power et al., 2007; Raykov et al., 2004). En un estudio que utilizó células tumorales cargadas con el virus de la Estomatitis Vesicular (VSV), se determinó que en presencia de un alto título de anticuerpos neutralizantes capaces de inhibir completamente la dosis de VSV administrado solo, las células transportadoras no se veían afectadas y eran capaces de transportar y producir la infección en el tejido diana (Power y Bell, 2008). Sólo se han realizado tres estudios preclínicos utilizando virus replicativos transportados por células. Uno de los estudios utilizó células tumorales ováricas PA-1 infectadas con el Virus Herpes Simplex (HSV) administrados intraperitonealmente en un modelo xenoinjertado de cáncer de

ovario. Otro estudio utilizó células tumorales de mama MDA-MG-231 infectadas con adenovirus salvaje administrado por vía sistémica en un modelo metastático xenoinjertado de cáncer mamario en pulmón. En ambos estudios no se obtuvieron efectos antitumorales significativos, pero se determinó la baja toxicidad observada tras la administración de este sistema celular terapéutico. Un tercer estudio realizado en un modelo murino inmunocompetente demostró que el virus Ad-GM-CSF transportado en células tumorales presentó un efecto antitumoral significativo a través de una mayor respuesta antiviral y antitumoral de los linfocitos T citotóxicos (CTL) (Hamada et al., 2007)

TABLA 4. Resumen de algunos virus oncolíticos transportados por células

Nombre	Tipo de célula	Tipo Tumor	Referencia
Herpes virus 1716	PA-1 tumorales de ovario	Ovario	(Coukos et al., 1999)
Parvovirus H-1	MH3924A tumorales de hígado	Pulmón	(Raykov et al., 2004)
Adenovirus salvaje	MDA-MB-231 tumorales de mama	Metástasis mamaria a Pulmón	(García-Castro et al., 2005)
Measles virus	Células T	Mieloma múltiple	(Ong et al., 2007)
Measles virus	Monocitos Célula endotelial PBMCs PBMC-células derivadas	Ovario Linfoma Hígado	(Iankov et al., 2007)
Reovirus Dearing tipo 3	Células dendríticas Células T	Melanoma	(Ilett et al., 2009)
Virus de la Estomatitis Vesicular	CT26 tumorales de colon A549 tumorales de pulmón LI210 leucemia	Colon	(Power et al., 2007)
Adenovirus-GM-CSF	A549 tumorales de pulmón 293 células transformadas embrionarias de riñón	Ovario	(Hamada et al., 2007)
Adenovirus 5/3	Células progenitoras mesenquimales	Ovario	(Komarova et al., 2006)
Adenovirus 5	Células mesenquimales	Pulmón Mama	(Hakkarainen et al., 2007)
Vaccinia virus	Células Cik (del inglés <i>Cytokine-induced killer cells</i>)	Ovario	(Thorne et al., 2006)

IV. OBJETIVOS

En medicina humana, los adenovirus de replicación selectiva representan una alternativa prometedora para el tratamiento del cáncer. Los resultados clínicos actuales en pacientes demuestran que presentan buen perfil de seguridad, aunque su eficacia terapéutica después de la administración sistémica es limitada principalmente por la presencia de anticuerpos neutralizantes anti-adenovirus. En medicina veterinaria, la actividad antitumoral de adenovirus de replicación condicionada no ha sido probada en perros, aunque estudios preclínicos muestran un buen efecto terapéutico después de la administración intratumoral. Sin embargo, la especie canina también presenta altos títulos de anticuerpos neutralizantes anti-adenovirus canino tipo 2 como resultado de la inmunización vaccinal o por infección natural, por lo que se espera que los anticuerpos preformados induzcan rápidas neutralizaciones que comprometan la administración sistémica de adenovirus oncolíticos.

El **objetivo general** de esta tesis es:

Desarrollar una estrategia de transporte sistémico de un adenovirus canino condicionalmente replicativo que sea capaz de evadir los anticuerpos neutralizantes e infectar las células tumorales de osteosarcoma canino.

Se desarrolla en los siguientes **objetivos específicos**:

- Determinar la biodistribución *in vivo* de células tumorales caninas cargadas con un adenovirus canino condicionalmente replicativo y su capacidad de infectar tumores en presencia de anticuerpos neutralizantes.
- Evaluar la eficacia antitumoral *in vivo* de diferentes protocolos de administración de células tumorales caninas cargadas con un adenovirus canino condicionalmente replicativo, para diseñar el mejor protocolo terapéutico de administración en perros con osteosarcoma.
- Obtener datos preliminares de toxicidad y eliminación viral después de la administración intratumoral y sistémica de células tumorales caninas cargadas con un adenovirus canino condicionalmente replicativo en perros con osteosarcoma.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. CARACTERIZACIÓN DE ADENOVIRUS RECOMBINANTE

1.1 GENERACIÓN ADENOVIRUS RECOMBINANTE

Los adenovirus caninos OCCAV y CAV-GFP utilizados en este trabajo derivan del adenovirus canino tipo 2 (CAV2). El CAV2 (GenBank U77082) fue obtenido de la ATCC (American Type Culture Collection, VR-800).

OCCAV (Hemminki et al., 2003) fue amablemente cedido por el Dr. Akseli Hemminki, del grupo de Terapia Génica del Cáncer, Facultad de Biomedicina de la Universidad de Helsinki, P.O, Finlandia. En el OCCAV el control de la expresión de E1A está bajo promotor de osteocalcina.

CAV-GFP (Kremer et al., 2000) fue amablemente cedido por el Dr. Eric Kremer, del Instituto de Genética Molecular de Montpellier, CNRS 5535, Montpellier, Francia; y de la Universidad de Montpellier, Montpellier, Francia. En el CAV-GFP la región E1A fue sustituida por el casete de expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control del promotor del Citomegavirus (CMV).

AdTL (AdGFPLuc) (Alemany and Curiel, 2001) deriva del adenovirus humano tipo 5 (hAd5). En AdTL la región E1A ha sido sustituida por el casete de expresión *track-luc* (TL). Este casete contiene el gen de la luciferasa (*luc*) y de la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control del promotor del CMV.

Tanto el CAV-GFP como el AdTL, al no tener la región E1A, son vectores que no replican y por tanto necesitan de células empaquetadoras como las *DkCre* y HEK293 que contienen la región E1A. Estas células complementan en *trans* la función de E1A y permiten al vector no replicativo completar el ciclo viral.

1.1.1 Selección de clones de adenovirus recombinantes para el ensayo de formación de calvas

Con el objetivo de disponer de un stock homogéneo de los virus recombinantes, se obtuvieron clones aislados de adenovirus recombinantes y se seleccionaron los clones correctos. El ensayo de formación de calvas se basó en la infección inicial de una monocapa celular con un banco de diluciones del lisado inicial de adenovirus para posteriormente cubrir la monocapa de las células

infectadas con una matriz de agarosa, que permitió el intercambio de gases y de nutrientes con el medio pero no el intercambio de la progenie viral, para que los viriones liberados de la primera infección sólo pudiesen infectar las células vecinas. Las calvas se formaron después de sucesivas rondas de replicación de los adenovirus.

Se preparó un banco de diluciones seriadas (10^4 a 10^9) a partir del lisado inicial en medio DMEM al 5% de suero fetal bovino desactivado (FBS). Con 1 ml de la dilución se infectó un pocillo de una placa de 6 pocillos (6mm de diámetro) de células *DkCre* al 80-90% de confluencia y se dejó que la infección tuviese lugar durante 4-6 horas. Se retiró el medio de infección y se agregaron 2 ml de una solución estéril de agarosa y medio de relación 1:1 previamente preparada, a partir de una solución de agarosa al 1% a 56°C y el medio DMEM complementado con un 10% de FBS, antibióticos y temperada a 37°C. El medio con la agarosa se dejó solidificar durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA) y a continuación se agregaron 2 ml de medio DMEM al 5% de FBS sobre la matriz de agarosa. Las placas se dejaron en el incubador hasta que a los 5-7 días se comenzaron a ver las primeras calvas virales, cada una correspondiente a un clon diferente. Las calvas se produjeron como resultado de las sucesivas replications de un virus único inicial. Con el objetivo de obtener las calvas, se retiró el medio líquido sobre la agarosa y se perforó la agarosa con la punta de una pipeta de 200 µl. Las calvas se aspiraron con la pipeta y se resuspendieron en 500 µl de DMEM.

Para comprobar la identidad del adenovirus, se infectó una placa de 100mm para la obtención del ADN viral por el método de Hirt's (ver apartado 1.3.1.2) y se caracterizó, tal y como se detalla a continuación.

1.1.2 Amplificación y purificación de adenovirus

La amplificación y purificación de adenovirus permite la obtención del virus en una cantidad suficientemente grande y en una formulación adecuada como para ser utilizado en los ensayos *in vitro* e *in vivo*.

La amplificación de adenovirus se basó en la propagación del virus en placas de cultivos cada vez más grandes y en mayor cantidad.

La purificación de adenovirus se basó en la separación de los virus producidos de los restos del cultivo celular, por ultracentrifugación en un gradiente de cloruro de cesio. A continuación se describen ambos métodos:

1.1.2.1 Amplificación de adenovirus

Para amplificar los adenovirus caninos se utilizó la misma línea celular utilizada para su generación. Así, para amplificar CAV-GFP, CAV2 y OCCAV se utilizó las células DkCre. Mientras que la amplificación del vector AdTL se realizó en las células HEK293.

Para la amplificación de adenovirus recombinantes, se partió de un clon aislado en el ensayo de formación de calvas, que se fue amplificando por sucesivas infecciones de placas cada vez más grandes. En condiciones normales de propagación, con el lisado celular se pudieron infectar 10 placas de la misma medida de la cual provenían. Una vez obtenidas dos placas de 150 mm de diámetro infectadas con adenovirus recombinante, ya se tuvo un extracto celular con suficiente cantidad de virus para realizar todos los experimentos *in vitro*. Para realizar los experimentos *in vivo*, se continuó la amplificación viral hasta obtener 30-40 placas de 150 mm de diámetro infectadas.

Cuando las células estuvieron a una confluencia del 80% se infectaron con 10 m.o.i. (unidades formadoras de calva por célula o multiplicidad de infección) las DkCre, 25 m.o.i las D17, 100 m.o.i las Abrams y 5 m.o.i las HEK293. La infección se realizó a partir de un virus purificado o de un lisado celular. Después de una incubación de 48 a 72 horas para los vectores CAV-GFP, CAV2 y OCCAV y, una incubación de 36 horas para AdTL, a 37°C al 5% CO₂, el efecto citopático fue evidente en el 95-100% de las células. Una vez el 80% de las células se encontraron desenganchadas se recogió el pellet y se almacenó a -80°C.

En la amplificación final, previa purificación del adenovirus, las células se recogieron cuando el 95-100% de las células en cultivo presentaron un efecto citopático evidente. En este momento se recogió el virus producido: se recogieron las células y el sobrenadante (SN) de cada una de las 30-40 placas y se centrifugaron en tubos de 50 ml, tipo falcon, durante 5 minutos a 750-1000g. Se guardaron 40 ml de sobrenadante y el resto se descartó por aspiración. Los pellets celulares se guardaron en 5 ml de sobrenadantes con el objetivo de resuspender el pellet. Tanto los pellets como los SN se almacenaron congelados a -80°C.

1.1.2.2 Purificación de los adenovirus

Todos los adenovirus se purificaron con la finalidad de obtener un stock de virus purificado en una formulación y concentración adecuada para ser administrada a los ratones por vía intratumoral o sistémica.

El método utilizado en este estudio para la purificación de los adenovirus se basó en la ultracentrifugación de una gradiente de densidades hecha con diferentes concentraciones de cloruro de cesio (CsCl). Este método permitió la separación de las partículas virales del resto de los elementos presentes en el lisado celular -como son las cápsides virales vacías, los restos celulares, etcétera- y concentrar las partículas virales. La eliminación del CsCl se hizo posteriormente por diálisis contra el tampón deseado.

Para liberar las partículas virales del interior de las células, a los pellets celulares provenientes de la amplificación viral, se les realizaron tres ciclos de congelación (-80°C) y descongelación (37°C). Posteriormente, la suspensión se centrifugó en tubos de 50 ml, tipo falcon, durante 5 minutos a 750-1000g para precipitar los restos celulares. El sobrenadante es el que llamamos extracto celular clarificado (CEC, *Cell Extract Clarified*), que contenía los adenovirus a purificar. El CEC se cargó sobre la gradiente de cloruro de cesio para la separación de las partículas adenovirales de los restos de cultivo celular.

El gradiente de CsCl estuvo compuesto de 3 soluciones:

- Solución A: 1.5 gr/ml CsCl en PBS
- Solución B: 1.35 gr/ml CsCl en PBS
- Solución C: 1.25 gr/ml CsCl en PBS

El gradiente de densidad de cloruro de cesio se preparó en 4-6 tubos de la ultracentrífuga (Beckman). Para formar el gradiente se agregaron las siguientes cantidades de las soluciones:

- 1^{er}o 0.5 ml solución A
- 2^{do} 2.5 ml solución B
- 3^{er}o 2.5 ml solución C

Después de hacer el gradiente de CsCl, se agregaron 7 ml del CEC en cada tubo de ultracentrífuga ajustando con sobrenadante, guardado durante la

recolección del virus durante el proceso de amplificación viral, hasta un volumen final de 12.5 ml por tubo de ultracentrifugación.

Los tubos se centrifugaron durante una hora a 10°C a 150.000 g [35.000 rpm (rotor SW41, Beckman)]. En estas condiciones, las partículas virales se separaron de los restos celulares y se concentraron en un punto del gradiente de densidad correspondiente a la densidad de la partícula viral, que para el CAV2 correspondió a 1.22 gr/ml y para el hAd5 fue de 1.32 gr/ml.

Después de la centrifugación aparecieron dos bandas blanquecinas que correspondieron al virus. Las cápsidas vacías quedaron en la banda superior y se descartaron por aspiración junto con los restos celulares. En la banda inferior quedaron las cápsidas virales llenas que se retiraron con pipeta y se sometieron a una segunda ultracentrifugación, esta vez en un gradiente de cloruro de cesio continua.

Para los vectores CAV-GFP, CAV2 y OCCAV los tubos de ultracentrifugación se llenaron con las bandas de virus mezcladas con una solución de 1.3 mg/ml de cloruro de cesio (obtenida a partir de una mezcla uniforme de una solución de 1.35 mg/ml y de una solución de 1.25 mg/ml de cloruro de cesio). Para AdTL los tubos de ultracentrifugación se llenaron con las bandas de virus mezcladas con una solución de 1.35 mg/ml de cloruro de cesio. Se centrifugó durante 16 horas a 10°C a 150.000 g [35.000 rpm (rotor SW41, Beckman)].

Al final de la segunda centrifugación se obtuvo una banda blanquecina que correspondió al adenovirus. La banda se retiró con una pipeta y se introdujo en una membrana de diálisis previamente equilibrada en 500 mL de agua miliQ autoclavada durante 30 minutos. Se dializó en un volumen de 500 ml de PBS⁺⁺ (1 L PBS 1x, 1 ml de solución de MgCl₂ 10gr/L, 1 mL de solución de CaCl₂ 10g/L) a 4°C en agitación durante 2 horas, tiempo al cual se cambió el tampón de diálisis y se dejó dos horas más en las mismas condiciones. En el tercer y último cambio del tampón PBS⁺⁺ se complementó con glicerol a una concentración final de 5%, para conservar el virus alícuotado. Se realizó una titulación del número de partículas virales por ml mediante espectrofotometría (ver apartado 1.2.1) y se prepararon alícuotas que se guardaron a -80°C.

La amplificación y purificación del virus OCCAV para su administración en perros se realizó en la Unidad de Producción de Vectores en el Centro de

Biotecnología Animal y Terapia Génica (CBATEG) de la Universidad Autónoma de Barcelona, en cumplimiento de la normativa de Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) para controlar los niveles de calidad, trazabilidad y funcionalidad del virus inyectado.

1.2. TÉCNICAS EMPLEADAS PARA TITULAR ADENOVIRUS

1.2.1 Determinación de las partículas físicas por espectrofotometría

Este protocolo se basó en la determinación de la absorbancia del ADN viral a una longitud de onda de 260 nm, para determinar el número de partículas virales (vp) totales de un stock viral purificado, sin discriminar entre partículas virales infectivas y defectivas.

Se tomaron 5 µl de suspensión viral dializada y 95 µl del tampón de lisis (Tris 10nM, EDTA 1nM, 0.1% SDS, pH 8.0). Se homogenizó utilizando un vortex. Para lisar las cápsidas virales, la mezcla se incubó durante 5 minutos a 56°C y se determinó la densidad óptica en el espectrofotómetro a las longitudes de onda de 260 nm y 280 nm. El valor de la densidad óptica obtenida a la longitud de onda de 260 nm se multiplicó por 20 (factor de dilución) y por 1×10^{12} , el número resultante equivalió a partículas virales por ml.

La ratio entre la absorbancia de la muestra a 260 nm y 280 nm, dio una idea de la integridad de la muestra purificada, que óptimamente debió de estar alrededor de 1.4.

1.2.2 Determinación de las partículas virales infectivas

Este protocolo se basó en el recuento del número de células positivas para la inmunotinción de la proteína viral del hexón en una monocapa de células infectadas con diluciones seriadas del virus. Permitted determinar el número de partículas funcionales, o unidades de transducción (TU), de stocks virales purificados y de extractos celulares.

Se prepararon en triplicado un banco de diluciones 1/10 del stock viral en placas de 96 pocillos -utilizando el medio de cultivo como medio de dilución- en un volumen final de 100 μ l. Se agregó una suspensión celular de DkCre o HEK293 a razón de 50.000 células por pocillo en 50 μ l de medio. Después de una incubación a 37°C durante 24 horas se procedió a la inmunodetección. El medio de cultivo se retiró y las células se dejaron secar durante 5 minutos. Para fijar las células, se agregaron 100 μ l por pocillo de metanol frío y se dejó fijar por 10 minutos a -20°C. Posteriormente, se realizaron tres lavados con una solución de PBS⁺⁺ (1 L PBS 1x, 1 ml de solución de MgCl₂ 10gr/L, 1 mL de solución de CaCl₂ 10gr/L) 1% BSA. La adición de iones bivalente, como lo son el calcio y el magnesio, ayudaron a prevenir el desprendimiento de las células de los pocillos y el BSA actuó como solución de bloqueo. Luego, las células se incubaron con un anticuerpo primario anti-hexón (2Hx-2, ATCC) dilución 1:5 durante 2 horas a 37°C. Se realizaron nuevamente tres lavados con una solución de PBS⁺⁺ 1% BSA. Se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo Alexa 488 (Invitrogen) diluido 1:300 en PBS⁺⁺ 1% BSA durante 2 horas a 37°C en oscuridad. Después de tres lavados más, se determinó el título funcional viral en el microscopio invertido de fluorescencia, a través del recuento de las células positivas por pocillo que representan las células infectadas con el adenovirus. El título viral, número de unidades de transducción por ml, se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{TU/ml} = (\text{media del conteo de las células positivas de los tres pocillos de la misma dilución} \times \text{factor de dilución} \times 1000 \mu\text{l}) / 100 \mu\text{l}$$

Para los virus CAV-GFP y AdTL no fue necesario realizar la tinción del hexón del adenovirus, ya que al contener la proteína GFP, después de la incubación de la infección por 24 horas a 37°C se realizó directamente el conteo de las células GFP positivas por pocillo al microscopio invertido de fluorescencia. El título viral se determinó de la misma manera anteriormente descrita.

1.3 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE ADENOVIRUS

1.3.1 Obtención del ADN viral

El ADN viral se obtuvo a partir de tres materiales de partida diferentes: a partir del sobrenadante de las células infectadas, a partir de las células infectadas y a partir de los virus purificados. A continuación se describen los procedimientos y las indicaciones de uso para cada uno de ellos.

1.3.1.1. Obtención del ADN de adenovirus a partir del sobrenadante de células infectadas

Se partió de 340 µl del sobrenadante de células infectadas a los cuales se agregaron para un volumen final de 400 µl:

- 16 µl EDTA 0.5M pH 8.0 (20 mM final)
- 20 µl SDS 10% (0.5% final)
- 8 µl proteinasa K 10 mg/ml (0.2 µg/µl final)

La mezcla se incubó durante 2 horas a 56°C. La proteinasa K con la ayuda del SDS degradó la cápside proteica y el EDTA intervino como agente protector del ADN liberado. La mezcla se dejó temperar y el ADN se extrajo con fenol:cloroformo y se precipitó con etanol 100% con acetato sódico al 2% peso/volumen (g/100ml). Finalmente, el precipitado de ADN se resuspendió en 25 µl de agua bidestilada.

1.3.1.2 Obtención del ADN de adenovirus a partir de células infectadas (Hirt's)

Este procedimiento permitió la obtención de una cantidad suficiente de ADN para hacer un análisis de restricción y de secuenciación.

Se infectaron las células DkCre o HEK293 sembradas en placas de 100 mm de diámetro al 80% de confluencia con una décima parte del lisado celular. Cuando el efecto citopático fue completo, se recogieron las células infectadas y el sobrenadante en un tubo de 15 ml, tipo falcon. La suspensión celular se centrifugó 5 minutos a 750-1000g, se retiró el sobrenadante y el precipitado celular se

disolvió en 1.5 ml de PBS, traspasándolo a un tubo tipo eppendorf. Las células se centrifugaron 5 minutos a 750-1000g. El sobrenadante se retiró y el precipitado celular se disolvió en 350 µl de la solución HIRT's 2X (10 nM Tris pH 8.0, 20 nM EDTA, 1.2% SDS y 200 µg/ml de proteinasa K). Se incubó a 56°C durante una hora. Se agregaron 200 µl de NaCl 5M (final 1M) gota a gota en agitación continua sobre un vortex. Se dejó a 4°C entre 8 a 16 horas hasta que apareció un precipitado blanco, que correspondió al ADN celular. Para eliminar el ADN celular, la suspensión se centrifugó durante 30 minutos a 16.000-18.000g a 4°C, tiempo al cual apareció un precipitado blanco. Se recogió el sobrenadante y se agregó RNasa a concentración final de 100 µg/µl. Se dejó incubar a 37°C durante una hora. Se realizó una extracción de ADN con fenol:cloroformo y se precipitó con etanol 100% con acetato sódico al 2% peso/volumen (gr/100ml). Finalmente, el ADN se disolvió en 25 µl de agua bidestilada o Tris-EDTA (TE) pH 8.0.

1.3.1.3. Obtención del ADN de adenovirus a partir de virus purificado

Este procedimiento se realizó para corroborar la correcta identidad de los adenovirus que fueron purificados en el marco de este trabajo. El material de partida fueron virus purificados. A partir de 2×10^{10} partículas virales, que corresponden a 1µg de ADN, se agregaron:

- EDTA pH 8.0 (16µl 0.5M)
- SDS (20µl 10%)
- Proteinasa K (8µl 10mg/ml)
- TE pH 8.0 hasta un volumen final de 400µl.

La mezcla se incubó a 56°C durante 2 horas. A continuación, se realizó una extracción con fenol:cloroformo del ADN y se precipitó con etanol 100% con acetato sódico al 2% peso/volumen. El precipitado de ADN se disolvió en 25 µl de agua bidestilada o TE pH 8.0.

1.3.2 Digestión con enzimas de restricción y secuenciación del ADN de adenovirus

Ambas técnicas se utilizaron para corroborar la correcta identidad de los adenovirus a partir del ADN viral, tanto si fueron obtenidos a partir de las células infectadas o a partir de los virus purificados.

1.3.2.1 Digestión con enzimas de restricción

A partir de aproximadamente 500-800 ng de ADN viral obtenido a partir de las células infectadas o de los virus purificados, se agregaron: 1 unidad de enzima, el tampón adecuado a la enzima proporcionado por la misma casa comercial 10x y agua bidestilada hasta un volumen final de 20 μ l.

Para la mayoría de las enzimas de restricción, se dejó que la reacción de digestión tuviese lugar durante 2 horas a 37°C.

Los fragmentos de la digestión se resolvieron en conjunto con el ADN del vector no modificado como control y con un marcador de peso molecular comercial en geles de agarosa al 1% en Tris Acetato-EDTA (TAE).

Las enzimas de restricción que se utilizaron para los adenovirus caninos fueron: *EcoRI* y *XhoI*. Mientras que la enzima que se utilizó para el AdTL fue: *Sal I*. El patrón de digestión de ADN viral con estas enzimas nos permitió hacer una valoración de la integridad del genoma viral.

1.3.2.2 Reacción de secuenciación

Para la secuenciación del ADN viral se partió de 100 ng del ADN viral y se agregaron 5 μ l de la mix de secuenciación 3.1 de la casa comercial Applied Biosystems, 5 μ l del tampón de secuenciación 2x (contiene los dNTPs y ddNTPs, cada uno de ellos marcados con un fluorocromo diferente) y 3.2 pmols del cebador (Tabla 5). Se agregó agua bidestilada hasta un volumen final de 10 μ l.

Las condiciones de la reacción de secuenciación fueron:

- 24 ciclos de 30 segundos a 96°C
- 15 segundos a 50°C
- 4 minutos a 60°C

Las reacciones de la secuencia se analizaron con un secuenciador automático del Servicio de Secuenciación y Genómica del Servicio Científico de la Universidad de Barcelona.

Tabla 5. Secuencia aminoacídica de los cebadores utilizados para la secuenciación de Adenovirus

	Secuencia aminoacídica
CAV277	5'-TGCCAGTTCCTCCACGCCTAAT-3'
CAV574r	5'-CGGCTGCCACTCTCCAGTAGC-3'
Fiber up2	5'-GAACAGTTCAAAGTGCTCAT-3'
Fiber up3	5'-CTTATTAAGACCCTGTGCGGT-3'
Fiber up6	5'-GGAAACTAGGACTAAAGTA-3'

1.4 ENSAYOS *IN VITRO* CON ADENOVIRUS RECOMBINANTES

1.4.1 Características de las líneas celulares

En este trabajo se utilizaron líneas celulares para el trabajo con los adenovirus y otras líneas celulares tumorales caninas para los estudios *in vitro* e *in vivo*.

A continuación se describen brevemente las características de las líneas celulares utilizadas para la generación y propagación de los adenovirus y de las líneas celulares tumorales.

1.4.1.1 Líneas celulares para el trabajo con los adenovirus

1.4.1.1.1 Células DkCre

Las células DkCre fueron amablemente cedidas por el Dr. Kremer (Instituto de Genética Molecular de Montpellier, CNRS 5535, Montpellier, Francia; Universidad de Montpellier, Montpellier, Francia) y su obtención y caracterización se describen en Kremer et al. (2000).

Las células DkCre derivan de la línea celular DK (*dog kidney cells*). Estas células DkCre contienen la región CAV2-E1 integrada en su genoma, con la región E1A bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV) y la región E1B bajo el control de su propio promotor.

Las células *DKCre* son células empaquetadoras y se utilizaron para la amplificación y titulación de los adenovirus caninos enmarcados en este trabajo.

1.4.1.1.2 Células HEK293

Las células HEK293, derivan de células embrionarias de riñón humano que han sido transformadas con el 11% del extremo izquierdo del genoma del adenovirus, incluyendo el gen E1 (Graham et al., 1977). El producto del gen E1A y E1B de las células HEK293 permite la replicación de los adenovirus exentos de esta región, que son los vectores no replicativos, como lo es el AdTL.

Otra característica de las células HEK293 es que son altamente permisivas a la infección y crecimiento de los adenovirus, al expresar los receptores CAR e integrinas de entrada de los adenovirus. Son células empaquetadoras y se utilizaron para la amplificación y titulación de adenovirus humano.

1.4.1.2 Líneas tumorales caninas

La línea celular tumoral de osteosarcoma canino D17 fue obtenida de la ATCC (del inglés *American Type Cell Culture*) (CRL-6248). Las células D17 derivan de un tumor de osteosarcoma metastático pulmonar.

La línea celular de osteosarcoma canino Abrams fue cedida amablemente por Dr. David Vail (School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin-Madison, Wisconsin, USA).

1.4.2 Condiciones de cultivos de las líneas celulares

Las líneas celulares que se utilizaron en este estudio crecieron formando una monocapa celular con morfología epitelial adherida al soporte sólido en el cual se cultivaron.

Las líneas celulares se mantuvieron con DMEM (del inglés *Dulbecco's Modification of Eagle's Medium*, Gibco BRL) complementadas con suero fetal bovino (FBS, Gibco BRL), previamente inactivado en un baño húmedo durante 30 minutos a 56°C, al 5% para las células HEK293, *DkCre* y Abrams; y al 10% de FBS para las

células D17. A los medios de cultivo se les agregaron una mezcla de los antibióticos penicilina y estreptomycin (Gibco BRL), a 100 U/ml y 100 µg/ml, respectivamente, en una proporción 1:100. En todos los casos, el medio se renovó cada 2-3 días por aspiración del medio viejo y adición del medio nuevo. Las células se mantuvieron en un incubador humidificado a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂.

1.4.3 Recuento celular

Para determinar el número de células de un cultivo y sembrar la cantidad deseada, las células se tripsinizaron (Trypsina-EDTA de Gibco BRL) y se resuspendieron en DMEM al 5% FBS. De la suspensión celular se tomó una alícuota y se realizó una dilución con el colorante azul de tripán, de manera que se pudiesen contar entre 10 y 100 células por cuadrante de la cámara de Neubauer o hemocitómetro. El azul de tripán penetró en el interior de las células sólo cuando la membrana celular se encontró deteriorada. Para el recuento de las células viables en una solución celular, se contaron las células viables presentes en cada uno de los 4 u 8 cuadrantes de la cámara de Neubauer y se hizo una media. El cálculo de células por ml se realizó mediante la siguiente fórmula:

Nº células/ml: Media del nº de células viables por cuadrante x dilución x 10⁴

Este cálculo permitió determinar la concentración y el porcentaje de viabilidad del cultivo celular. Finalmente, las células se resuspendieron con el medio que fue necesario para llevar las células del cultivo a la concentración deseada.

1.4.4 Congelación y descongelación de las líneas celulares

Para la criopreservación de las células, primero fueron tripsinizadas y luego se lavaron dos veces con PBS y se contaron como se indica en el apartado 1.4.3.

Las células se llevaron a una concentración de entre 5 y 20 millones de células por ml en medio de congelación, que contuvo un 90% FBS inactivado (Gibco BRL) y un 10% del agente crioprotector DMSO (Di-metil-sulfóxido, Sigma).

La suspensión celular se distribuyó a razón de 0.5 ml por criotubo y los viales se congelaron en un tanque de alcohol isoamílico, que colocado a -80°C

disminuyó la temperatura progresivamente. A partir de las 4h, las alícuotas se pasaron a los tanques de nitrógeno líquido para ser almacenados.

Para la descongelación, las células se pasaron del tanque de nitrógeno líquido a un baño a 37°C para que la descongelación fuese rápida. La suspensión celular se pasó a un tubo de 15 ml tipo falcon y se realizó una centrifugación de 5 minutos a 750-1000g. El medio de congelación se retiró por aspiración y las células se resuspendieron con el medio de cultivo que correspondió a cada una de las líneas celulares, temperado a 37°C. A las 16h las células se encontraron mayoritariamente adheridas y se realizó un cambio de medio para eliminar las células muertas.

1.4.5 Control de micoplasma en las líneas celulares en cultivo

La contaminación por micoplasma pasa visualmente desapercibida en los cultivos, pero puede afectar los resultados experimentales. La prueba de micoplasma se realizó de forma rutinaria en todas las líneas celulares en cultivo. Esta prueba se basa en la detección del microorganismo por PCR con los cebadores MICO-1 y MICO-2 (Tabla 6).

Tabla 6. Secuencia aminoacídica de los cebadores utilizados para la detección de micoplasma

	Secuencia aminoacídica
MICO-1	5'-GGCGAATGGGTGAGTAACACG-3'
MICO-2	5'-CGGATAACGCTTGCGACTATG-3'

Para la realización de la PCR se partió del medio de cultivo de las células cuando pasaron al menos 3 días de cultivo en situación de sobre-confluencia y en ausencia de antibióticos. Si por PCR se detectó la presencia de micoplasma, la prueba se dio por positiva y se procedió a la desmicoplasmatización de las células con Plasmocin™. Después del tratamiento, se realizó nuevamente la prueba para confirmar la eliminación.

1.4.6 Ensayo de producción y liberación viral del adenovirus recombinante

Con el objetivo de realizar el ensayo de producción y liberación viral, se sembraron un número conocido de células en placas de 24 pocillos en un volumen de 1 ml de medio, para que en el momento de la infección las células se encontrasen en un 80% de confluencia. Para la infección de las células, se retiró el medio y se infectó por triplicado con 500 μ l de solución viral previamente preparadas. Las soluciones virales se prepararon en unidades de transducción por célula (TU/célula o m.o.i.), de manera que se infectasen el 100% de las células en cultivo. El número de m.o.i. necesarias para alcanzar un 100% infección de las células en cultivo dependió de cada línea celular utilizada: DkCre se infectó a 10 m.o.i., D17 a 25 m.o.i. y Abrams a 100 m.o.i.

Las células se incubaron con la solución viral durante 4h a 37°C. Pasado este tiempo, se retiró el medio de infección por aspiración y se lavaron las células 3 veces con PBS para eliminar el virus remanente. Se agregó medio nuevo. El sobrenadante (SN) y el extracto celular total (sobrenadante más células) se recogieron a diferentes horas post-infección. A tiempos cortos, el virus detectado en la muestra correspondió al virus remanente de la infección y las muestras recogidas a tiempo final cuantificaron la cantidad de virus producido. La evaluación de la cinética de producción viral requirió tomas de muestras cada 24 horas.

Una vez recogidas las muestras, se realizaron tres ciclos de congelación y descongelación de los extractos celulares, con el objetivo de lisar las células y liberar el virus al medio de cultivo. Los extractos celulares se centrifugaron a 750-1000g durante 5 minutos para posteriormente titular los sobrenadantes libres de células a través de la técnica de tinción del hexón (apartado 1.2.2). Las muestras de sobrenadante se titularon directamente sin necesidad de realizar ciclos de congelación y descongelación o centrifugación.

Para la determinación de la cinética de producción viral en células infectadas e irradiadas el procedimiento fue el mismo, pero 4h después de la infección las células fueron sometidas a una irradiación a una dosis única de 30 Gy, utilizando un irradiador con fotones de 6 Mv empleando un acelerador lineal (Clinac 600, Varian) a una tasa de dosis de 2,7 Gy/minuto.

Las diferencias significativas en la producción y liberación de adenovirus entre las diferentes líneas celulares fueron evaluadas por una Prueba-T no pareada a dos colas. La significancia estadística fue determinada en $p < 0.05$.

1.4.7 Análisis de la citotoxicidad

El análisis de la citotoxicidad de los virus replicativos se basó en la medida de la viabilidad celular después de la exposición al virus, que en este trabajo fue determinado a través del análisis de la proteína total remanente en el pocillo después de la infección viral.

Para la determinación de la viabilidad celular a través del análisis de la proteína total se utilizó el ensayo del ácido bicinconínic (BCA) (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Esta técnica combinó la reducción de iones de Cu^{2+} a Cu^{1+} por parte de las proteínas que se encuentren en un medio alcalino, conocida como reacción Biuret, junto con la elevada sensibilidad y selectividad que tienen estos iones (Cu^{1+}) de ser detectados utilizando el ácido bicinconínic. La reacción de dos moléculas de BCA con un Cu^{1+} generó un producto de color violeta, cuya absorbancia se determinó a una longitud de onda de 592nm.

El ensayo de citotoxicidad se realizó preparando diluciones seriadas de los stocks virales, por triplicado, en medio de cultivo en placas de 96 pocillos. Las diluciones virales se prepararon en un volumen final de 50 μl . La concentración viral en el primer pocillo fue de 200 TU/célula, mientras que las diluciones seriadas realizadas fueron de 1/10 para las células *DkCre* y 1/5 para las células D17. Posteriormente, se agregaron 100 μl de una suspensión celular a razón de 1×10^5 (*DkCre*) o 5×10^4 (D17) células por pocillo. A los 5 días (*DkCre*) u 8 días (D17) después de la infección, se procedió a la determinación de la viabilidad celular de cada pocillo por tinción del contenido proteico. Brevemente, el medio de infección se retiró y las células se lavaron con PBS para eliminar el FBS remanente del medio cultivo. A continuación, las células se resuspendieron con 200 μl de la solución de BCA e incubaron durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, se determinó la absorbancia a 540 nm.

Las curvas dosis-respuesta se presentaron como la viabilidad relativa respecto al 100% de células vivas presentes en el pocillo de células no infectadas. La determinación de la IC_{50} , que correspondió a la cantidad de virus necesario para

lisar el 50% de las células en cultivo, se estimó a partir de unas curvas dosis-respuesta por regresión estándar no lineal (GraFit; Erithacus Software Ltd., Surrey, United Kingdom) usando una adaptación de la ecuación de Hill.

1.4.8 Medida de la actividad de la luciferasa

La luciferasa es una enzima que oxida la luciferina emitiendo bioluminiscencia. La eficiencia de transducción en el ensayo de infectividad *in vitro* se determinó midiendo la actividad de la luciferasa de los extractos celulares con el kit comercial de Promega.

La eficiencia de transducción se midió a las 48h después de la infección en las células HEK293. El protocolo se detalla a continuación: se retiró el medio de cultivo y se agregó 50 μ l por pocillo del tampón especial para la lisis celular RLB 1X (*Reporter Lysis Buffer*, Promega). Se mantuvo por 10 minutos a temperatura ambiente (TA) y posteriormente se realizó un ciclo de congelación y descongelación para lisar las células (-80°C/TA). Las células lisadas se recogieron y se centrifugaron durante 5 minutos a 750-1000g a 4°C. Se recogió el sobrenadante, que correspondió al extracto celular, sobre el cual se determinó la medida de la actividad de luciferasa y de la cantidad de la proteína total.

Para la medida de la actividad de la luciferasa se tomaron 8 μ l del extracto celular que se mezcló con 20 μ l del LAR (*Luciferasa Assay Reagent*, Promega) en un tubo de luminómetro. Para que la cuantificación de la actividad de luciferasa fuese la óptima el extracto celular y el LAR se encontraron a temperatura ambiente. Debido a que la emisión de la luz decae rápidamente, la medida se realizó inmediatamente en un luminómetro durante 10 segundos (Berthold Junior, Berthold). Para normalizar las medidas de bioluminiscencia de los extractos celulares se cuantificó la concentración de la proteína. Los resultados se expresaron en RLU (*Relative Light Units*) por μ g de proteína.

La cuantificación de la concentración de proteína en el extracto celular se determinó por el método Bradford utilizando el Kit comercial Bio-Rad Protein Assay (BioRad, Alemania) que no interfirió con los detergentes presentes en el tampón de lisis RLB.

La absorbancia de la mezcla del extracto celular con el reactivo de Bradford se determinó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. La

cantidad de proteína presente en el extracto celular se obtuvo extrapolando las absorbancias obtenidas en una recta patrón, construida a partir de las absorbancias determinadas por diferentes patrones de soluciones de albúmina sérica bovina (BSA). Para la cuantificación se utilizaron 5 µl del extracto celular, por triplicado.

2. TÉCNICAS UTILIZADAS EN LOS ENSAYOS *IN VIVO* Y EN PERROS DE LAS CÉLULAS TUMORALES CANINAS INFECTADAS CON OCCAV

2.1 CEPAS DE RATONES UTILIZADAS Y CONDICIONES DE ESTABULACIÓN

Para la realización de este trabajo se utilizaron ratones atómicos Balb/C nu/nu (Harlan™). En todos los casos los animales fueron machos de 4-8 semanas de edad con un peso de 20-30 gramos. Los ratones se mantuvieron estabulados a una temperatura controlada de entre 22-24°C con ciclo de luz/oscuridad de 12h y una dieta estándar de agua y de comida *ad libitum*.

La manipulación y la estabulación de los animales se realizó en las instalaciones del I'DIBELL (AAALAC, unidad 105) de acuerdo a las recomendaciones de la federación FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) para el correcto tratamiento y uso de los animales de laboratorio y bajo la aprobación del comité ético de experimentación animal del Instituto de Investigación Oncológica-IDIBELL.

2.2 IMPLANTACIÓN SUBCUTÁNEA DE CÉLULAS TUMORALES EN RATONES

Las células Abrams se sembraron en placas de cultivos de 150 mm de diámetro y se mantuvieron en condiciones habituales de cultivos *in vitro*. En el momento de la implantación de las células tumorales, las células se tripsinizaron, se contaron, se lavaron con PBS y se diluyeron en el volumen de PBS necesario para la implantación del número de tumores deseado en un volumen final de 150 µl por tumor. El número de células implantadas por tumor fue de 1×10^7 .

La implantación de los tumores se realizó mediante la inyección subcutánea de 150 µl de la suspensión celular en los flancos posteriores de los ratones, generando así dos tumores por ratón. La inyección subcutánea se realizó con una

jeringa hipodérmica con una aguja de 29G. Después de la implantación se hizo un seguimiento del crecimiento tumoral por palpación. Las dos dimensiones palpables de los nódulos tumorales se midieron con un pie de rey; y el volumen de cada tumor se calculó mediante la fórmula:

$$\text{Volumen (mm}^3\text{)} = A \times B^2 \times (\pi/6)$$

donde, A corresponde a la dimensión mayor y B a la dimensión menor, ambas en mm.

Cuando los nódulos tumorales alcanzaron un volumen de entre 80-150 mm³, los ratones se distribuyeron al azar en grupos experimentales. Los grupos experimentales fueron constituidos por 10-12 tumores/grupo. Las diferencias significativas en la tasa de crecimiento tumoral entre grupos de tratamiento fue evaluado por una Prueba-T no pareada a dos colas. La significancia estadística fue determinada en $p < 0.05$.

2.3 ADMINISTRACIÓN DE ADENOVIRUS

La administración *in vivo* en ratones de las soluciones celulares irradiadas infectadas con virus y de las soluciones virales correspondieron a diluciones hechas en PBS; las soluciones virales correspondieron siempre a diluciones hechas a partir de los stocks de virus purificados. Para la administración en perros las diluciones fueron hechas en suero fisiológico a partir de un stock purificado en el Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica (CBTEG), bajo condiciones de buenas prácticas de laboratorio (BPL).

2.3.1 Inmunización en ratones

La inmunización se generó a través de una única inyección intraperitoneal con el virus OCCAV o AdTL, según el experimento, utilizando agujas hipodérmicas de 29G. La dosis de inmunización correspondió a 2.5×10^{10} partículas virales por ratón, en un volumen de 200 μ l al 5^{to} ó 9^{no} día experimental, según el experimento.

2.3.2 Inyección intratumoral de las células cargadas con adenovirus y de adenovirus

Para evaluar la eficacia intratumoral de las células transportadoras de virus, las células tumorales D17 ó Abrams se infectaron con el virus a una m.o.i. de 25 (células D17) ó 100 (células Abrams) y se incubaron durante 4h a 37°C. Posteriormente las células se tripsinizaron y lavaron 3 veces con PBS, para posteriormente ser sometidas a una dosis de irradiación de 30 Gy.

Para la inyección intratumoral en ratones de las células tumorales cargadas con virus se preparó una dilución a una concentración de 2.5×10^6 células por tumor en un volumen de 25 μ l. El stock del virus OCCAV se preparó a una concentración de 1×10^{10} partículas virales por tumor también en un volumen de 25 μ l. Para la inyección múltiple intratumoral, se utilizó la misma dosis de células cargadas con virus o del virus sólo durante 3 días consecutivos. La administración se realizó con una jeringa Hamilton, con una aguja de 25 mm de longitud y 33G, en diferentes puntos del tumor.

Para la inyección intratumoral en perros de las células tumorales cargadas con el virus OCCAV, se preparó una dilución homogénea de una mezcla de células tumorales de osteosarcoma D17 y Abrams a una concentración de 3×10^8 células en un volumen de 5 ml. La administración se realizó con una aguja hipodérmica de 21G, en tres puntos del tumor.

2.3.3 Inyección sistémica de las células cargadas con adenovirus y de adenovirus

Para la administración sistémica de las células tumorales cargadas con virus, las células se infectaron con los adenovirus de la misma manera anteriormente descrita.

En ratones se preparó una dilución a una concentración de 5×10^6 células por ratón en un volumen de 200 μ l y el stock de los adenovirus se prepararon a una concentración de 5×10^{10} partículas virales en un volumen de 200 μ l/ratón. La inyección se realizó con agujas hipodérmicas de 29G. La administración endovenosa se realizó por cualquiera de las dos venas laterales de la cola del ratón.

En perros se preparó una dilución homogénea de la mezcla celular a una concentración de 3×10^8 células en un volumen de 500 ml de suero fisiológico (Braun). La administración sistémica (500ml/perro) se realizó por la vena cefálica con un catéter intravenoso de 20G (Vasofix[®], Braun) utilizando un equipo para transfusión de sangre Sangofix[®]B (Braun) con un filtro estándar de 200 μ m, durante un tiempo de 45 minutos.

2.4 INMUNOSUPRESIÓN CON CICLOFOSFAMIDA

En ratones la inmunosupresión se obtuvo a través de la administración de Ciclofosfamida (CPA) (Genoxal[®], Baxter). La CPA fue disuelta en 0.9% NaCl a una concentración final de 20mg/ml y fue almacenada a 4°C en oscuridad. El protocolo de administración de la CPA en ratones consistió en una inyección intraperitoneal al día 15 experimental, a una dosis única de 250 mg/Kg durante la primera semana y, posteriormente, una dosis de 50 mg/kg dos veces a la semana durante 19 días.

2.5 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

2.5.1 Obtención de muestras de sangre y suero

En ratones la extracción de sangre se realizó por punción intracardiaca después de sacrificar al animal en una cámara de CO₂, siempre como un procedimiento terminal. La obtención de sangre se realizó con una aguja hipodérmica de 25G. En perros la extracción de sangre se realizó por punción de la vena yugular con una aguja hipodérmica de 21G.

Las muestras de sangre fueron coleccionadas en tubos con anticoagulante EDTA para el análisis del hemograma, con heparina para el análisis de la analítica bioquímica, o bien sin anticoagulante para la obtención del suero. El suero se obtuvo realizando una centrifugación a 1000-1500g durante 15 minutos a temperatura ambiente y se conservaron a -80°C hasta el momento de su procesamiento.

El análisis del hemograma se realizó en el Servicio de Hematología Clínica Veterinaria, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona.

2.5.2 Obtención de tumores y órganos

Para la obtención de tumores, hígados y pulmones los ratones se sacrificaron en la cámara de CO₂. Los tumores se separaron del tejido conectivo con la ayuda de material quirúrgico. A continuación se lavaron con solución salina y se dividieron por la mitad con una hoja de bisturí. Una mitad se fijó en formaldehído al 4% durante 16h, para su posterior inclusión en parafina, y la otra se incluyó en OCT. La obtención del pulmón e hígado se realizó para el estudio de la biodistribución de la GFP en el tejido pulmonar y hepático murino y, se obtuvo a continuación de la extracción de tumores. Una vez extraído el pulmón e hígado de los ratones, se lavaron con una solución salina y se realizaron pequeños cortes de cada uno de los lóbulos hepáticos con una hoja de bisturí. Los cortes se fijaron en formaldehído al 4% durante 16h.

En perros las muestras de tejido se obtuvieron en el momento de la necropsia realizada en las instalaciones del Servicio de Diagnostico de Patología Veterinaria, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona. Una vez se obtuvieron las muestras tumorales y de los órganos, una mitad se fijó en formaldehído al 4% durante 16h, para su posterior inclusión en parafina y la otra se conservó rápidamente a -80°C hasta el momento de su procesamiento.

2.5.2.1 Inclusión de tejidos en parafina

La fijación e inclusión de los tejidos en parafina permitió conservar la morfología de los tejidos y además le otorgó la consistencia necesaria para permitir realizar cortes histológicos suficientemente finos como para ser observados en el microscopio. Para permitir que la parafina penetrara en el tejido, primero de todo fue necesario deshidratarlos mediante una batería de alcoholes etílicos de graduación creciente.

Los tejidos fueron lavados con solución salina para eliminar el fijador, a continuación se sumergieron durante 1h en etanol 70%, durante 2h en etanol 96% y toda la noche en un etanol 96% renovado. Al día siguiente se pasaron por una batería de 3 etanoles al 100% (1h 30 min en cada etanol) y finalmente se sumergieron en xilol durante 1h y 30 min. Una vez deshidratados se sumergieron durante toda la noche en parafina líquida en una estufa a 65°C y al día siguiente se incluyeron en los bloques. Para realizar los bloques se utilizó un aparato que mantiene la parafina líquida a 60°C y que tiene un dosificador que permite rellenar

los moldes, junto a una placa que está a una temperatura de 4°C y que permite la solidificación homogénea de los bloques.

2.5.2.2 *Inclusión de tejidos en OCT*

La inclusión de tejidos tumorales en OCT se realizó en el mismo momento de la obtención de las muestras. Los tumores se colocaron en moldes Criomold (Tissue Tek Sakura) en donde previamente se les había agregado una capa de matriz crioprotectora O.C.T (Tissue Tek Sakura) y se congelaron rápidamente en nieve carbónica. Las muestras se guardaron a -80°C hasta el momento de su procesamiento.

2.6 EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE TRANSDUCCIÓN *IN VIVO*

Como en el ensayo de transducción *in vitro*, la eficiencia transduccional de AdTL en el ensayo *in vivo* se evaluó determinando la actividad del gen reportero luciferasa. La cuantificación de la actividad de la luciferasa se realizó a partir de extractos tisulares.

2.6.1 Cuantificación de la actividad de luciferasa en extractos tisulares

A las 72h de la administración sistémica, los animales se sacrificaron y se procedió a la extracción de los tejidos y de los órganos, los cuales se conservaron rápidamente a -80°C hasta el momento de su procesamiento.

De los órganos se hizo un fino polvo con un mortero de cerámica sostenido en un baño de nitrógeno líquido, sin dejar que la muestra se descongelara. Los polvos se pasaron a un tubo tipo eppendorf y se pesaron. Se agregó el tampón de lisis especial para tejidos CCLR (*Cell Culture Lysis Reagent*, Promega) previamente complementado con un cóctel de inhibidores de las proteasas (Amersham Pharmacia) a razón de 1 ml de CCLR por cada 100 mg de polvo tisular. Se homogenizó la mezcla con la pipeta y se centrifugó durante 15 min a 750-1000g. El sobrenadante correspondió al extracto tisular del cual se hizo la cuantificación de la actividad luciferasa siguiendo el procedimiento de los ensayos *in vitro*.

La cuantificación de la proteína se hizo a partir de una dilución 1/10 en PBS del extracto tisular utilizando el BCA Protein Assay Kit (Pierce) que no tiene interferencia con el CCLR. Para la cuantificación de la proteína se siguió el mismo procedimiento que con el reactivo de Bradford, pero tomando la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 540 nm. Los resultados se expresaron en RLU normalizados por mg de proteína.

Las diferencias significativas en los niveles de expresión de luciferasa entre los grupos fue evaluado por una Prueba-T no pareada a dos colas. La significancia estadística fue determinada en $p < 0.05$.

2.6.2 Estudio de la distribución de GFP en pulmón e hígado

La distribución de la GFP en el tejido pulmonar y hepático murino se analizó a partir de cortes histológicos incluidos en O.C.T.

Para la visualización de la GFP las muestras de pulmón e hígado se fijaron en 4% de paraformaldehído e incubaron en una gradiente ascendente de sacarosa. Primero en una solución de sacarosa 5% en PBS durante 2 horas a 4°C, después en una solución de sacarosa 10% en PBS durante 2 horas más a 4°C y finalmente en una solución de sacarosa 30% en PBS durante 16h a 4°C. Las muestras de pulmón e hígado fueron posteriormente colocadas en moldes Criomold (Tissue Tek Sakura) en donde previamente se agregó una capa de matriz crioprotectora O.C.T (Tissue Tek Sakura) y se congelaron rápidamente en nieve carbónica. Las muestras se guardaron a -80°C hasta el momento de su procesamiento.

Las secciones de tejido fueron crioseccionadas y posteriormente montadas en portaobjetos, en donde se pusieron dos secciones de la misma muestra para obtener duplicados. La expresión de la GFP se determinó a través de un microscopio de fluorescencia (Olympus BX60; Olympus America, Melville, NY) y las imágenes se tomaron con una cámara digital en color (Olympus U-RFL-T), utilizando el programa SPOT Advanced 3.2.4 (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI).

2.7 ENSAYO DE NEUTRALIZACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-ADENOVIRUS

El ensayo de la determinación de los anticuerpos neutralizantes anti-adenovirus presentes en el suero utilizado en este trabajo, se basa en la determinación de la inhibición del 50% de la infección celular después de la exposición a un virus en presencia de anticuerpos neutralizantes.

Las muestras de suero se incubaron a 56°C durante 30 minutos con el objetivo de inactivar las proteínas del complemento.

El ensayo de seroneutralización se realizó preparando diluciones virales, por triplicado, en placas de 96 pocillos. Las diluciones virales se prepararon en medio de cultivo hasta obtener un stock final de concentración 1×10^4 TU/ml en muestras séricas murinas y 1×10^6 TU/ml en muestras séricas caninas. Posteriormente se realizaron las diluciones seriadas del suero utilizando la dilución de virus, donde en el primer pocillo correspondió a una 1/10, seguida de 9 diluciones seriadas $\frac{1}{2}$. A un pocillo se le agregó sólo la dilución del virus sin suero (control positivo), mientras que a otro pocillo no se agregó virus (control negativo). Las muestras de suero se incubaron con el virus durante una hora a temperatura ambiente. Luego, se agregó 100 μ l de una suspensión celular a razón de 5×10^4 células de DkCre o HEK293 por pocillo. Finalmente, se dejó en incubación durante 24 horas a 37°C. La determinación del título de anticuerpos neutralizantes se realizó en el microscopio de fluorescencia, donde el título correspondió a la dilución donde existe un 50% de la inhibición de la infección comparado con el pocillo control positivo.

2.8 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

2.8.1 Obtención de cortes histológicos

En este trabajo se realizaron dos tipos de cortes histológicos: a partir de bloques de parafina y a partir de bloques de OCT. En todos los casos, los cortes se colocaron en portaobjetos previamente tratados con Poly-L-lisina (Sigma), con tal de aumentar la adherencia de las muestras. Este tratamiento consistió en sumergir los portaobjetos 5 minutos a temperatura ambiente en una solución de Poly-L-lisina al 0,5% en agua destilada. En todos los portaobjetos, se pusieron dos secciones de la misma muestra para obtener duplicados.

2.8.1.1 *Cortes histológicos parafinados*

A partir de bloques de parafina, previamente enfriados a -20°C, se obtuvieron cortes de 4 µm de grosor con un micrótopo de rotación. Una vez cortados, las secciones de tejido se estiraron en un baño de agua destilada caliente (42°C) para conseguir su máxima extensión. Los cortes se recogieron del baño con un portaobjeto poly-L-lisinado y se dejaron secar a 37°C durante 30 minutos.

2.8.1.2 *Cortes histológicos congelados*

En este caso se partió de las muestras preservadas en O.C.T. Los bloques se cortaron en secciones de 4 µm de grosor con la ayuda de un criostato (Shandon cryotome cryostat; Global Medical Instrumentation, Ramsey, MN) que mantuvo las muestras congeladas a -20°C. A medida que se fueron realizando los cortes se fueron colocando en portaobjetos a temperatura ambiente. La diferencia de temperatura entre la muestra congelada y el portaobjeto a temperatura ambiente permitió la rápida adhesión de la muestra. Las criosecciones se guardaron a -80°C hasta el momento de su procesamiento.

2.9 INMUNOHISTOQUÍMICAS

2.9.1 Inmunohistoquímica en cortes parafinados

En este trabajo se realizaron dos tipos de inmunohistoquímicas en cortes de tejidos parafinados de tumor: para detectar a los adenovirus y para detectar la expresión de osteocalcina. El protocolo utilizado para la detección de adenovirus y de osteocalcina fue el mismo, variando únicamente los anticuerpos primarios y secundarios utilizados (Tabla 7). En todos los casos las incubaciones se realizaron en cámaras húmedas sin permitir nunca que los tejidos se secaran; todas las soluciones se prepararon en el momento de su uso. El protocolo utilizado se detallada a continuación:

Tabla 7. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en las inmunohistoquímicas en tejidos parafinados.

Anticuerpo	Antígeno	Origen	Dilución	Casa Comercial
Ab6982	Proteínas cápside viral	Policlonal de conejo	1/100	Abcam
OCG4 (ab13421)	Osteocalcina	Monoclonal de ratón	1/100	Abcam
Envision+System-HRP antirabbit	Anticuerpo de conejo	Monoclonal de cabra	Puro	DakoCytomation
Envision+System-HRP antimouse	Anticuerpo de ratón	Monoclonal de cabra	Puro	DakoCytomation

- *Desparafinación de las muestras.* Las muestras se desparafinaron por incubación de las secciones durante toda la noche a 37°C o durante 2h en la estufa a 65°C y la posterior inmersión durante 5 minutos en una batería de cuatro xiloles, durante 5 minutos en una batería de tres etanoles 100% y durante 5 minutos más en una batería de tres etanoles de 96%, un etanol 70% y finalmente en un etanol 50%. Posteriormente, las muestras se lavaron por inmersión una vez en agua durante 5 minutos y luego 3 veces en PBS pH 7.4 durante 5 minutos.

- *Inhibición de las peroxidases endógenas.* Las peroxidases endógenas se inhibieron sumergiendo las muestras en peróxido de hidrógeno al 0.3% durante 10 minutos. Posteriormente, las muestras se lavaron por inmersión una vez en agua durante 5 minutos y luego 3 veces en PBS pH 7.4 durante 5 minutos.

- *Exposición antigénica.* Se realizó para el desenmascaramiento del antígeno. Los tejidos fueron permeabilizados con tampón citrato sódico 1x pH 6 en una olla a presión a máxima temperatura durante dos minutos. Posteriormente, las muestras se lavaron por inmersión una vez en agua durante 5 minutos y luego 3 veces en PBS pH 7.4 durante 5 minutos.

- *Bloqueo.* A continuación se realizó el bloqueo para reducir las uniones inespecíficas del anticuerpo. Las muestras se cubrieron con una solución al 20% de suero de caballo en PBS y se dejó en incubación en una cámara húmeda durante 1h a temperatura ambiente.

- *Inmunodetección.* Para proceder a la inmunodetección la solución de bloqueo se retiró y las secciones se cubrieron con una solución del anticuerpo primario diluido en PBS. La incubación se realizó durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente las muestras se temperaron durante 30 minutos y se lavaron 3 veces con PBS + 0.2%

Triton 100 durante 5 minutos. A continuación, los tejidos se cubrieron con Envision+System-HRP durante 30 minutos.

- *Revelado.* Las muestras se lavaron 3 veces más con PBS + 0.2% Triton 100 durante 5 minutos. A continuación, las secciones se cubrieron con el sustrato cromogénico DAB+ (Dako Cytomation K3468), durante aproximadamente 30 segundos, hasta la aparición de un precipitado marrón. La reacción se detuvo sumergiendo las muestras en agua del grifo durante 10 minutos. Posteriormente, las muestras se contratiñeron con el colorante de núcleo hematoxilina durante 1-2 minutos. Las muestras se lavaron durante 10 minutos con agua del grifo y se rehidrataron en una batería de etanoles de graduación creciente: 2 minutos en etanol 70%, tres veces durante 2 minutos en etanol 96%, tres veces durante 2 minutos en etanol 100% y cuatro veces durante 5 minutos en xilol. Finalmente, las muestras se montaron con un medio de montaje DPX (VWR Internation Ltd. Prod 360294H).

2.9.2 Inmunohistoquímica en cortes congelados

En este trabajo se realizó la inmunohistoquímica en cortes congelados de tumor para detectar los adenovirus. La ventaja de la detección de los adenovirus en cortes congelados es que es más fácil, más rápida y más sensible que la inmunodetección en cortes parafinados, pero tiene el inconveniente que la estructura y la morfología del tumor se conserva peor. Durante todo el protocolo las incubaciones se realizaron en cámaras húmedas y todas las soluciones se prepararon al momento de su uso.

Las secciones se dejaron temperar durante 30 minutos para luego ser fijadas por inmersión en una solución de formaldehído al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de realizar tres lavados de 2 minutos en agua destilada y uno de 10 minutos en PBS + 0.05% Tween 20, las secciones se cubrieron con la solución de bloqueo (20% suero de cabra o caballo en PBS) y se dejaron incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda. A continuación la solución de bloqueo se retiró y las secciones se cubrieron con una solución 1/100 del anticuerpo primario Ab6982 (Abcam) en PBS + 0.05% Tween 20 que permitió detectar las proteínas de la cápside viral. Para obtener un control negativo, una de las dos secciones de tejido que contiene el portaobjeto se incubó con PBS o con un anticuerpo inespecífico del mismo origen

que el anticuerpo primario diluido 1/100 en PBS. La incubación con el anticuerpo primario se realizó durante 1h a temperatura ambiente.

A continuación, las secciones se lavaron tres veces con PBS + 0.05% Tween 20 y se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario Alexa 488 antirabbit diluido 1/300 en PBS+0.05% Tween 20. Pasado este tiempo, las secciones se lavaron nuevamente con PBS + 0.05% Tween 20 y los núcleos se tiñeron con DAPI, para su observación en el microscopio de fluorescencia, directamente montando las secciones con el medio de montaje que contenía el colorante DAPI (DAKO).

Las imágenes de las inmunohistoquímicas para detectar la presencia del adenovirus en el tumor se tomaron con un microscopio de fluorescencia Olympus BX60 y una cámara digital en color (Olympus U-RFL-T), utilizando el programa SPOT Advanced 3.2.4 (Diagnostic Instruments).

3. TÉCNICAS ESPECÍFICAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO PRELIMINAR DE TOXICIDAD Y LIBERACIÓN DE OCCAV EN PERROS CON OSTEOSARCOMA INYECTADOS CON CÉLULAS TUMORALES INFECTADAS CON OCCAV

En este trabajo se realizaron dos estudios preliminares de la administración intratumoral y sistémica de las células tumorales caninas infectadas con OCCAV en perros con osteosarcoma.

3.1 PACIENTES

Los dos pacientes caninos cualificados para este estudio fueron atendidos en el Hospital Clínico Veterinario de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona. El diagnóstico de osteosarcoma apendicular se realizó mediante biopsia y los propietarios accedieron al estudio mediante consentimiento escrito. Los perros se encontraban en buen estado de salud, determinado mediante examen físico, hemograma y analítica bioquímica y ausencia de enfermedad metastásica y/o cualquier otra patología asociada.

La biopsia fue realizada en el Servicio de Diagnostico de Patología Veterinaria, el análisis del hemograma en el Servicio de Hematología Clínica

Veterinaria y la analítica bioquímica en el Servicio de Bioquímica Clínica Veterinaria de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona.

3.2 MONITORIZACIÓN CLÍNICA EN PERROS

Durante la administración de la terapia celular, los pacientes caninos fueron evaluados clínicamente a los tiempos determinados a través de la determinación de la frecuencia respiratoria, frecuencia cardíaca y temperatura corporal.

3.3 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

3.3.1 Obtención de muestras de orina

Las muestras de orina se obtuvieron mediante sondaje vesical a los tiempos determinados y fueron coleccionados en tubos tipo falcon previamente complementados con un cóctel de inhibidores de las proteasas (Amersham Pharmacia). Posteriormente, se realiza una centrifugación a 1000-1500g durante 10 minutos a 4°C y se descartó el pellet de células y sedimentos. El sobrenadante se conservó -80°C hasta el momento de su procesamiento.

3.3.2 Obtención de saliva

Las muestras de saliva se obtuvieron utilizando el sistema Salivette® (Sarstedt, Numbrecht, Alemania). Posteriormente los tubos fueron centrifugados a 1000-1500g durante 15 min y conservados a -80°C hasta el momento de su procesamiento.

3.4 DETERMINACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIRALES POR TINCIÓN DEL HEXÓN EN ORINA Y SALIVA

La determinación de las partículas virales funcionales presentes en las muestras de orina y saliva se detectaron a través de una inmunotinción de la proteína del hexón del adenovirus. La determinación de las partículas funcionales en las muestras biológicas secretadas/excretadas nos permitió valorar el potencial riesgo de transmisión del virus en el material biológico liberado.

A continuación se describe el protocolo: se preparó en triplicado un banco de diluciones 1/10 de las muestras de orina o saliva, en placas de 96 pocillos - utilizando el medio de cultivo como medio de dilución- en un volumen final de 100 μ l. Se agregó una suspensión celular de *DkCre* a razón de 50.000 células por pocillo en 50 μ l de medio. Después de una incubación a 37°C durante 24 horas se procedió a la inmunodetección de la misma manera anteriormente descrita (apartado 1.2.2). Finalmente, se determinaron las partículas virales presentes en las muestras de orina y saliva en el microscopio invertido de fluorescencia.

3.5 DETERMINACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIRALES POR PCR A TIEMPO REAL EN SANGRE Y ÓRGANOS

El ensayo se basó en la determinación del número de genomas virales en una muestra por amplificación del ADN por PCR a tiempo real (RT-PCR). El número de copias de ADN viral se cuantificó en relación a una curva patrón, realizada a partir de diluciones 1/10 de un stock del plásmido pTG5412 que contiene el genoma de CAV2, desde una concentración de 1×10^9 genomas/ μ l hasta una concentración de 1×10^1 genomas/ μ l.

3.5.1 Preparación de las muestras

La determinación de los genomas virales por RT-PCR se utilizó para cuantificar en el suero y órganos del perro la cantidad de adenovirus existente. Debido a que estas muestras contenían partículas virales, genomas virales no encapsidados, ácidos nucleicos provenientes de las células y proteínas celulares y virales, antes de realizar la RT-PCR fue necesario realizar una serie de pretratamientos a las muestras.

3.5.1.1 Obtención de ADN de extractos tisulares y del suero

La extracción del ADN genómico de las muestras de sueros se obtuvo utilizando el kit *Blood DNA Cell Culture* (Quiagen) y de las muestras de órganos utilizando el Kit Genomic DNA NucleoSpin Blood (Macherey-Nagel), según las indicaciones del fabricante.

3.5.2 RT-PCR

La técnica de la PCR a tiempo real se basó en una cinética de cuantificación que permitió determinar y registrar la formación de productos de PCR en tiempo real. Consistió en cuantificar, durante la fase exponencial de la reacción, los productos de PCR amplificados y marcados con un fluorocromo. En este trabajo se realizó una cuantificación absoluta del gen CAV2-E1A por RT-PCR mediante una sonda taqman específica para la región E1A de OCCAV. La GAPDH canina (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) se utilizó como un gen de expresión constitutivo para control interno. Para la determinación de la concentración de GAPDH en las muestras de los pacientes caninos, cantidades conocidas de ADN genómico canino (50, 5, 0.5 y 0.05 μ l) se amplificaron para generar una curva estándar (Fig. 8).

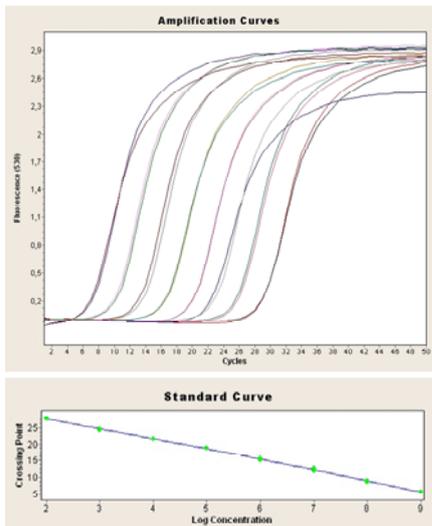


Figura 8. Curvas de amplificación correspondiente a toda la reacción de PCR. La técnica se basa en la determinación del número de genomas virales en una muestra por amplificación del ADN. Muestras en diluciones seriadas de factor 10 para la realización de una curva estándar.

Para la realización de la RT-PCR se preparó una mezcla que contenía:

- 1 μ l de muestra (ADN a cuantificar)
- 5 μ l de Premier Extaq 2x (Takara)
- 0.3 μ l de cada uno de los cebadores (CAV670F y CAV738R)
- 0.1 μ l de sonda taqman
- 3.3 μ l de agua.

La secuencia de los cebadores y de la sonda utilizadas fueron descritos previamente (Smith et al., 2002) y se detallan en la tabla 8. Todas las reacciones de RT-PCR se realizaron utilizando el termociclador LightCycler v2.0 (Roche Molecular Biochemicals), junto con un programa de análisis de los resultados LightCycler software v4.05.

Las condiciones de amplificación que se utilizaron fueron:

- Un ciclo de desnaturalización: 10 min a 95°C
- 40 ciclos de amplificación: 15 seg a 95°C, 1 min a 60°C

Tabla 8. Secuencia nucleotídica de los cebadores y la sonda utilizadas para cuantificación de genomas virales por RT-PCR

	Secuencia nucleotídica
CAV670F	5'- TGTGGGCCTGTGTGATTCCCT -3'
CAV738R	5'- CCAGAATCAGCCTCAGTGCTC -3'
CAV-Sonda taqman	FAM-CTCGAATCAGTGTCAGGCTCCGCA-TAMRA
GAPDH-F	5'- TGATGCCCCCATGTTTGTG-3'
GAPDH-R	5'- GTGCAGGAGGCATTGCTGA-3'
GAPDH-Sonda taqman	FAM- AGTTGTCATACTTCTCATGGTTCACGCCCA-TAMRA

VI. RESULTADOS

Una proporción importante de los adenovirus que se administran por vía sistémica son vulnerables a la inactivación por parte de las proteínas del complemento, a ser atrapados por el sistema retículo endotelial o bien neutralizados por los anticuerpos. Los anticuerpos neutralizantes (Nab's) son probablemente la barrera restrictiva más importante para un efectivo transporte del virus oncolítico al tumor (Power et al., 2007). La especie canina presenta anticuerpos anti-CAV2 como resultado de inmunizaciones vacunales o por infecciones naturales.

Una estrategia para reducir o evadir el efecto inhibitorio de los anticuerpos neutralizantes (Nab's) es la utilización de células transportadoras de virus. Las células tumorales actúan como "caballos de Troya" para el transporte del adenovirus, es decir, no sólo protegen al virus de los anticuerpos neutralizantes, si no que también amplifican la cantidad de virus inicialmente inoculada hasta su llegada a la célula diana.

En este trabajo, se estudió la capacidad de las células tumorales caninas infectadas *in vitro* y administradas sistémicamente de escapar de las defensas antivirales, alcanzar el tumor y, subsecuentemente, de liberar la progenie viral para infectar a la célula tumoral en un modelo xenoinjertado de osteosarcoma canino. El virus utilizado para este estudio fue OCCAV, un adenovirus oncolítico canino de replicación selectiva, que fue diseñado para el tratamiento del osteosarcoma canino (Hemminki et al., 2003). La selectividad tumoral de OCCAV hacia las células de osteosarcoma, se obtuvo a través de la inserción de un promotor específico de osteocalcina que controla la expresión del gen E1A.

Los resultados están ordenados siguiendo la cronología de la producción viral y la capacidad citotóxica de OCCAV respecto al adenovirus control CAV2 en líneas tumorales de osteosarcoma canino. Posteriormente, se evalúa el impacto que tiene la respuesta inmune preexistente en la distribución y transporte del adenovirus desnudo y en el adenovirus cargado en células tumorales caninas. A continuación, se analiza el efecto antitumoral *in vivo* de las células tumorales infectadas con OCCAV respecto a OCCAV desnudo. Finalmente, se realiza un estudio preliminar de toxicidad y liberación en perros con osteosarcoma inyectado con el sistema celular infectado con el OCCAV.

1. CARACTERIZACIÓN DE ADENOVIRUS RECOMBINANTE CANINO OCCAV

1.1. PRODUCCIÓN VIRAL DE OCCAV RESPECTO AL CAV2

Para comprobar la replicación de OCCAV en nuestro panel de células caninas se realizó un ensayo de producción viral infectando las líneas celulares *DkCre*, D17 y Abrams con los virus OCCAV y CAV2 con las m.o.i necesarias para obtener un 100% de infección. A diferentes tiempos post-infección, la cantidad de virus funcional presente en los extractos celulares totales y en los sobrenadantes se determinó por tinción del hexón.

Como se muestra en la figura 9A, en la línea celular *DkCre* la producción de los dos virus fue prácticamente idéntica, alcanzando las mismas concentraciones virales en los mismos tiempos. La producción de OCCAV por células en la línea celular *DkCre* a las 72h fue de 3809 TU/cel y de CAV2 fue de 3412 TU/cel. El análisis de la liberación del virus mostró resultados similares, en donde cantidades de OCCAV presentes en el sobrenadante fueron muy similares a la de CAV2.

En las células D17, la producción viral de OCCAV fue similar a la de CAV2 (Fig. 9B) al final del ciclo replicativo (72h). Sin embargo, a las 40h y 48h se detectaron diferencias en los títulos virales de ambos virus. La cantidad de OCCAV producido a las 40h –momento en que todo el CAV2 ya fue producido- fue 98 veces inferior a la cantidad de CAV2 producido (* $p < 0.01$) y a las 48h fue 8 veces inferior (* $p < 0.004$), lo que indicó que el ciclo replicativo de OCCAV en esta línea tumoral de osteosarcoma canino se encuentra enlentecido respecto al CAV2. La producción de OCCAV por células a las 72h fue de 1270 TU/cel y de CAV2 fue de 812 TU/cel. El análisis de la liberación de los virus también demostró que al final del ciclo replicativo la cantidad de OCCAV y CAV2 liberado al sobrenadante fue la misma. Sin embargo, a las 24h la cantidad de CAV2 liberado fue 4 veces menor que la de OCCAV (# $p < 0.01$) y a las 40h fue 10 veces inferior (# $p < 0.01$).

En la línea tumoral Abrams se observó un retraso en la producción de CAV2 respecto a OCCAV (Fig. 9C). A las 24h post-infección la cantidad de CAV2 producido fue 17 veces inferior a la de OCCAV (* $p < 0.001$) y a las 48h post-infección la cantidad de CAV2 producido fue 74 veces inferior (* $p < 0.02$). La producción de OCCAV por células en esta línea tumoral a las 72h fue de 45 TU/cel y de CAV2 fue

de 25 TU/cel. El análisis de la liberación de los virus indicó que a las 16h y 40h la cantidad de CAV2 liberado al sobrenadante fue 4 y 2 veces inferior ($\# p < 0.03$ y $p < 0.003$), respectivamente, comparado a OCCAV. Sin embargo, al final del ciclo replicativo la cantidad de OCCAV y CAV2 liberado al sobrenadante fue la misma.

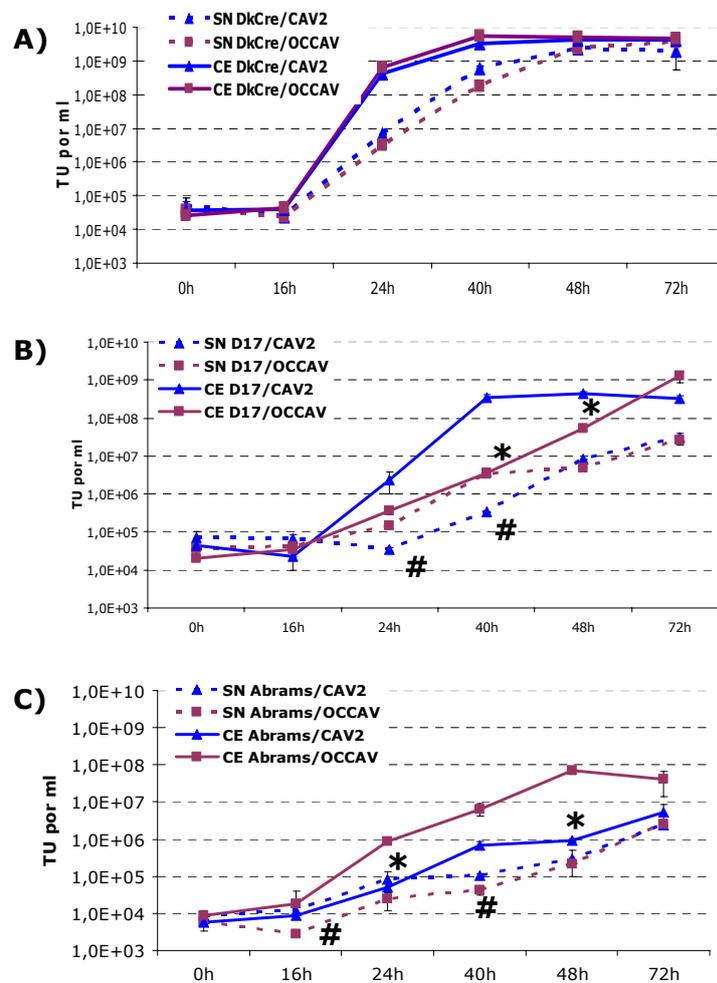


Figura 9. Caracterización de OCCAV. Análisis de la replicación viral de OCCAV comparado con CAV2. La línea celular *DkCre* (A) y las líneas tumorales caninas D17 (B) y Abrams (C) se infectaron con las m.o.i. necesarias para obtener un 100% de infección. Los extractos celulares totales y los sobrenadantes se recogieron a los tiempos indicados y fueron titulados por tinción del hexón. Los valores representan a las medias \pm DS de triplicados. TU, unidades de transducción; CE, extractos celulares; SN, sobrenadantes; DS, desviación estándar; * $p < 0.05$, significativo para los CE; # $p < 0.05$, significativo para los SN.

1.2 COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN VIRAL DE OCCAV EN CÉLULAS TUMORALES IRRADIADAS Y NO IRRADIADAS.

La administración *in vivo* de las células tumorales infectadas con el virus OCCAV requiere de una medida de seguridad adicional contra el riesgo oncogénico residual de las células tumorales que pudiesen escapar a la lisis inducida por el virus. Debido a que la radiación ionizante es una terapia de elección para abolir la multiplicación celular, se realizó un ensayo de producción viral en las células tumorales D17 y Abrams sometidas a radiación ionizante.

Para comprobar qué dosis de radiación entre 30 y 100 Gy era suficiente para eliminar la multiplicación de las células caninas (Hogge et al., 1999), las células D17 y Abrams fueron irradiadas a una dosis única de 30 Gy. La inhibición de la proliferación celular fue corroborada (datos no mostrados).

Las células tumorales caninas D17 y Abrams se infectaron con el virus OCCAV a las m.o.i necesarias para obtener un 100% de infección de las células en cultivo y, después de 4 h de infección, las células fueron sometidas a una dosis de radiación de 30 Gy. A diferentes tiempos post-infección, se recogieron los extractos celulares totales. La cantidad de virus funcional presente a los diferentes tiempos se titularon por tinción del hexón. Como se muestra en la figura 10, las líneas tumorales caninas irradiadas post-infección con el virus OCCAV permitieron eficientemente la replicación viral y la producción del virus. La producción del virus no se encontró afectada significativamente comparado con la ausencia de irradiación, alcanzando las mismas concentraciones virales en los mismos tiempos. Como en la producción viral en células no irradiadas, el virus OCCAV se replicó eficientemente en la línea celular D17 irradiada y el título viral en la línea celular Abrams irradiada fue significativamente más bajo. La producción viral por célula en la línea tumoral D17 irradiada fue de 750 TU/cel y en la línea tumoral Abrams irradiada fue de 54 TU/cel.

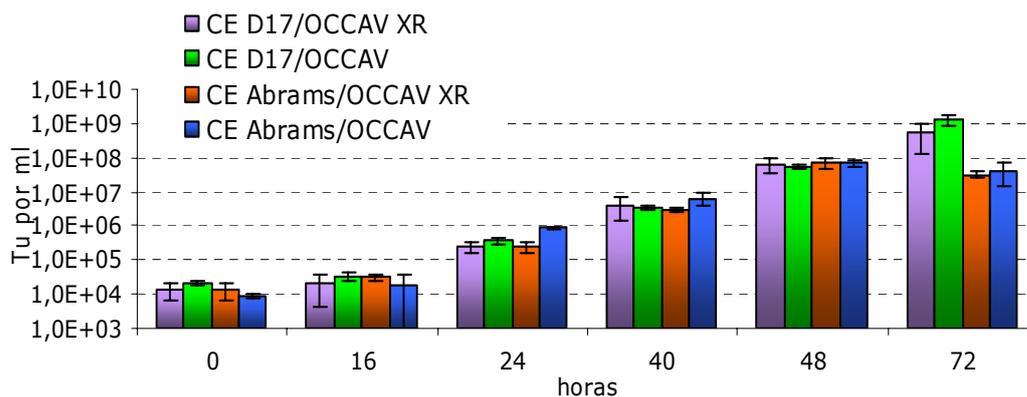


Figura 10. Efecto de la irradiación post-infección en la producción viral de OCCAV.

Comparación de la replicación viral de OCCAV en células controles no irradiadas y en células expuestas a radiación ionizante. Las líneas tumorales de osteosarcoma caninas D17 y Abrams se infectaron con las m.o.i necesarias para obtener un 100% de infección y luego fueron sometidas a una dosis de irradiación de 30 Gy. Los extractos celulares totales fueron recogidos a los tiempos indicados para la determinación de los títulos virales a través de la tinción del hexón. Los valores representan a las medias \pm DS de triplicados. TU, unidades de transducción; CE, extractos celulares; XR, radiación ionizante; Gy, unidad gray; DS, desviación estándar.

1.3 CAPACIDAD ONCOLÍTICA DE OCCAV RESPECTO AL CAV2

Para analizar la capacidad citotóxica del virus OCCAV se realizó un ensayo de citotoxicidad. Con esta finalidad, se infectaron las células *DkCre* y D17 con diluciones seriadas de OCCAV y CAV2. A los tiempos indicados y dependiendo de la susceptibilidad de cada línea celular al tratamiento viral, se determinó la supervivencia de las células (Fig. 11A) y se calculó la cantidad de virus necesaria para obtener un 50% de muerte celular (IC_{50}) (Fig. 11B). La cantidad de OCCAV requerido para causar una reducción de un 50% en la viabilidad celular en las células *DkCre* fue similar que la de CAV2 en la misma línea, donde la replicación del virus es independiente de E1A. En cambio, en la línea celular D17 se requirió 10 veces más OCCAV que CAV2 para eliminar el 50% de las células tumorales en cultivo. El ensayo de citotoxicidad en la línea tumoral Abrams no se pudo realizar por problemas técnicos; las células Abrams son células que acidifican el medio de cultivo rápidamente induciendo la muerte de la célula. Por lo tanto, en un ensayo de citotoxicidad donde se evalúa la capacidad citotóxica de un virus en sucesivas rondas de replicación, las células Abrams mueren por la acidificación del medio de cultivo que por la infección viral.

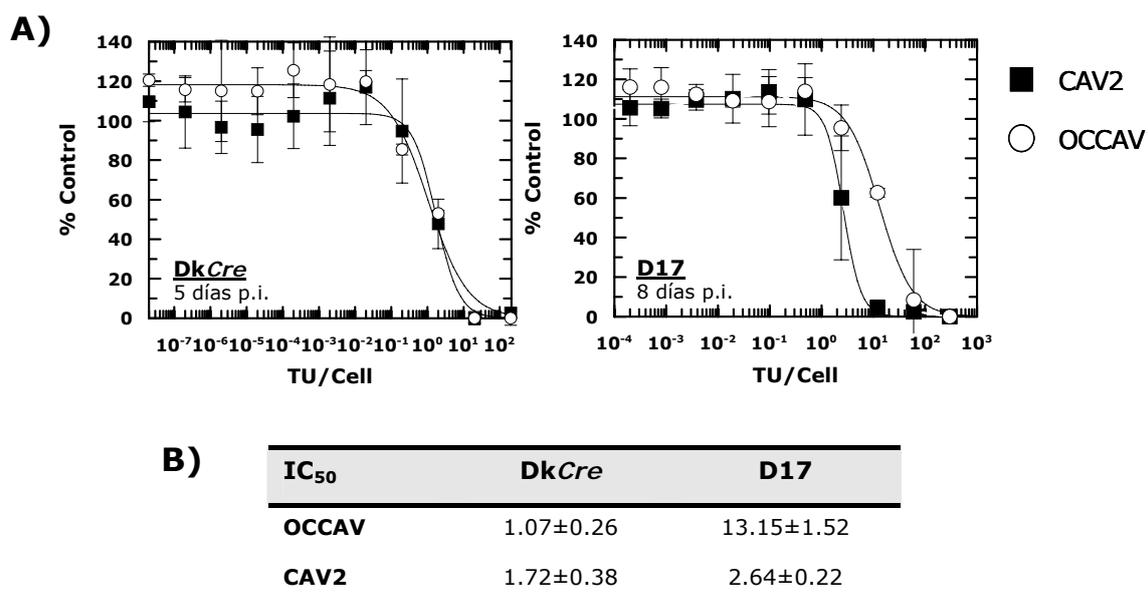


Figura 11. Perfil de citotóxicidad de adenovirus canino OCCAV respecto a adenovirus CAV2.

Las células DkCre y las células tumorales D17 se sembraron en placas de 96 pocillos y se infectaron con diluciones seriadas de los adenovirus OCCAV y CAV2. A los tiempos indicados se tiñeron los contenidos proteicos de cada pocillo y se midió la absorbancia. **(A)** Curvas dosis-respuestas. **(B)** La cantidad de TU por célula necesaria para producir el 50% de muerte celular (valor IC₅₀) se determinó a partir de una curva dosis-respuesta por regresión no lineal, mediante una adaptación de la ecuación de Hill.

2. ANÁLISIS DE LA BIODISTRIBUCIÓN Y EFICACIA ANTITUMORAL DE LAS CÉLULAS TUMORALES CANINAS INFECTADAS CON OCCAV

2.1 COMPARACIÓN DEL PATRÓN DE BIODISTRIBUCIÓN *IN VIVO* DE LAS CÉLULAS TUMORALES CANINAS INFECTADAS CON OCCAV RESPECTO A OCCAV DESNUDO

Para determinar *in vivo* si la administración sistémica de células tumorales caninas podían efectivamente transportar al virus hacia el parénquima tumoral en presencia de anticuerpos neutralizantes anti-adenovirus, se comparó la biodistribución del sistema de transporte mediado por células cargado con AdTL y de AdTL desnudo, en ratones inmunodeficientes y en ratones previamente inmunizados, a los cuales se les había implantado tumores subcutáneos de células Abrams.

2.1.2 Análisis de la biodistribución de AdTL transportado por células tumorales caninas y de AdTL desnudo en presencia de anticuerpos neutralizantes

El impacto que tiene la respuesta inmune preexistente en la biodistribución y transporte de AdTL desnudo y en AdTL transportado por el sistema celular se determinó a través de los niveles de expresión de luciferasa en el pulmón, hígado y tumor.

La figura 13 muestra que las células D17 no se quedaron atrapadas en los capilares pulmonares como se ha descrito previamente con otras células transportadoras no hematopoyéticas. Por el contrario, las células Abrams si quedaron en pulmón hasta al menos 72h tras la administración. La expresión de luciferasa en el pulmón de ratones no inmunizados e inmunizados inyectados con las células Abrams cargadas con AdTL fue 5 y 32 veces mayor respecto al PBS, respectivamente (Fig. 13A). Consecuentemente, en las imágenes de los cortes del pulmón capturados con el microscopio de fluorescencia se observó que la expresión de la GFP en los ratones no inmunizados inyectados con células Abrams infectadas con AdTL fue levemente mayor respecto a los que recibieron la inmunización. Como lo observado en la expresión de luciferasa, los pulmones de los ratones que recibieron la administración sistémica de las células tumorales D17 cargadas con AdTL resultaron negativas para la expresión de la GFP (Fig. 13B).

Como se muestra en la figura 14, la respuesta inmune preexistente afectó la transducción hepática de AdTL desnudo. A las 72h tras la administración sistémica de AdTL desnudo, se observaron elevados niveles de expresión de luciferasa en los hígados de los ratones no inmunizados. Por el contrario, los ratones inmunizados presentaron niveles de transducción hepática 370 veces más bajos que los no inmunizados ($^{\#}p < 0.038$) (Tabla 9). Cabe destacar que los niveles de luciferasa detectados en hígados de animales no inmunizados inyectados con AdTL desnudo fueron 9103 y 10970 veces mayores comparados con los ratones inyectados con células D17/AdTL y Abrams/AdTL, respectivamente, niveles que bajaron en presencia de anticuerpos neutralizantes (Tabla 10). Tanto en los hígados de los ratones inmunizados como en los no inmunizados que recibieron la administración sistémica de las células tumorales D17 y Abrams cargadas con AdTL, la expresión de luciferasa fue similar al detectado en los PBS en todos los grupos de ratones, lo que sugirió que el sistema de transporte celular fue capaz de evadir al hígado. En las imágenes de los cortes del hígado capturados con el microscopio de

fluorescencia se observó que la expresión de la GFP en ratones no inmunizados inyectados con AdTL desnudo fue mayor respecto a los que recibieron inmunización. Como lo observado con la expresión de la luciferasa, los hígados de los ratones que recibieron la administración sistémica de las células tumorales D17 y Abrams cargadas con el AdTL resultaron negativas para la expresión de la GFP (Fig. 14B).

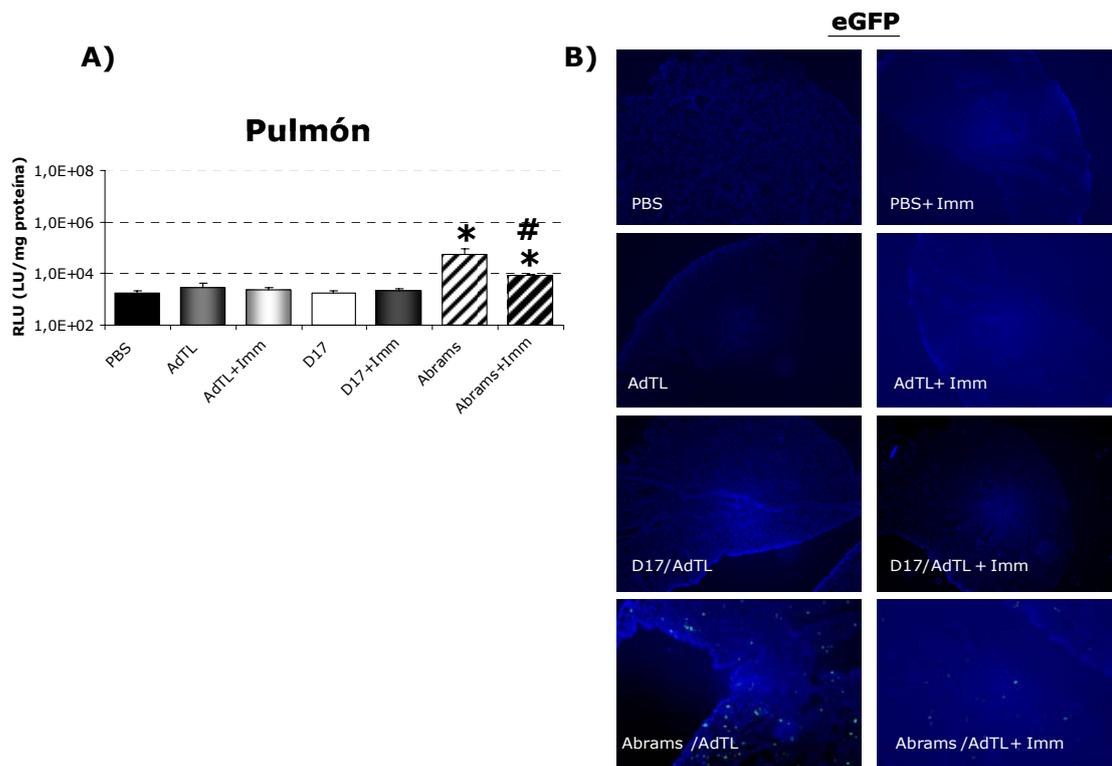


Figura 13. Análisis de la transducción pulmonar de adenovirus transportado por un sistema celular en un modelo inmunizado de osteosarcoma canino. Células de la línea Abrams fueron implantadas en ratones inmunodeficientes nu/nu. A los 9 días la mitad de los ratones fueron inmunizados (imm). A los 22 días, los animales fueron inyectaron sistémicamente con PBS o con una dosis única de AdTL desnudo (5×10^{10} vp/ratón) o de células tumorales D17 ó Abrams infectadas con AdTL (5×10^6 células/ratón). 72h p.i, los animales fueron sacrificados y los tejidos fueron lisados con un tampón adecuado (CCLR). A partir de los extractos tisulares se determinaron los niveles de expresión de luciferasa (los resultados se muestran en RLU [Light Units/ mg de proteína]) y la visualización de GFP. **(A)** Biodistribución de la expresión de la luciferasa a partir del extracto tisular pulmonar. **(B)** Visualización de la expresión de GFP en cortes de pulmón. Las imágenes de los cortes de tejido pulmonar se capturaron al microscopio de fluorescencia (4X). * $p < 0.05$, estadísticamente significativo comparado con el grupo PBS; # $p < 0.05$, estadísticamente significativo comparado con el grupo AdTL.

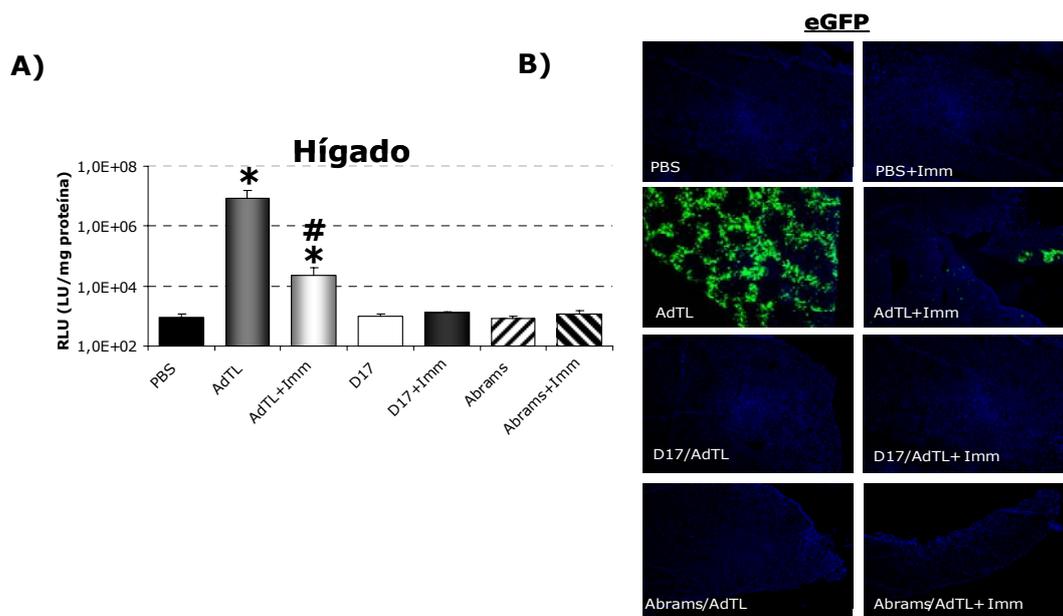


Figura 14. Análisis de la transducción hepática de adenovirus transportado por un sistema celular en un modelo inmunizado de osteosarcoma canino. Células de la línea Abrams fueron implantados en ratones inmunodeficientes nu/nu. A los 9 días la mitad de los ratones fueron inmunizados (imm). A los 22 días, los animales fueron inyectados sistémicamente con PBS o con una dosis única de AdTL desnudo (5×10^{10} vp/ratón) o de células tumorales D17 ó Abrams infectadas con AdTL (5×10^6 células/ratón). Setenta y dos horas p.i, los animales fueron sacrificados y los tejidos fueron lisados con un tampón adecuado (CCLR). A partir de los extractos tisulares se determinaron los niveles de expresión de luciferasa (los resultados se muestran en RLU [Light Units/ mg de proteína]) y la visualización de GFP. **(A)** Biodistribución de la expresión de la luciferasa a partir del extracto tisular hepático. **(B)** Visualización de la expresión de GFP en cortes del hígado. Las imágenes de los cortes de tejido hepático se capturaron al microscopio de fluorescencia (4X). * $p < 0.05$, estadísticamente significativo comparado con el grupo PBS; # $p < 0.05$, estadísticamente significativo comparado con el grupo AdTL desnudo.

Tabla 9. Efecto de la inmunización en la llegada de virus a tejidos/órganos.

	Ratios		
	Pulmón	Hígado	Tumor
AdTL/AdTL-imm	1.28x	370.20x	2.32x
D17/D17-imm	0.84x	0.78x	1.24x
Abrams/Abrams-imm	6.60x	0.66x	1.36x

* Imm, inmunización.

Como se muestra en la figura 15, la cuantificación de la actividad luciferasa a partir de los extractos tumorales mostró una elevada transducción en los tumores Abrams inyectados con AdTL desnudo en los ratones no inmunizados. Por el contrario, en ratones inmunizados se observó una reducción de 2 veces de la

expresión de luciferasa ($\# p < 0.036$) (Tabla 9). Sin embargo, la presencia de una respuesta inmune preexistente no afectó el transporte de AdTL mediado por las células tumorales caninas D17 y Abrams, que además ambas fueron capaces de liberar AdTL e infectar las células del parénquima tumoral (Tabla 9). Aunque la expresión de luciferasa en el grupo de ratones inmunizados inyectados con AdTL desnudo fue ligeramente mayor respecto a los grupos inyectados con el sistema de transporte viral mediado por células (con y sin inmunización) las diferencias no fueron significativas, demostrando así que ambas modalidades terapéuticas tuvieron una capacidad similar de transportar el virus al tumor y, por consiguiente, infectar a la célula del parénquima tumoral en presencia de anticuerpos neutralizantes *in vivo* (Fig. 15; Tabla 10).

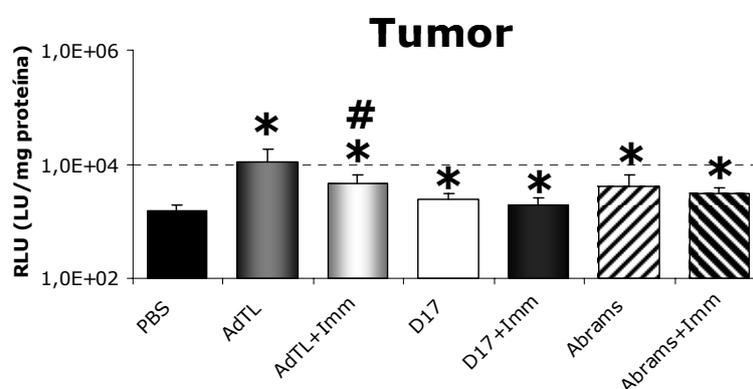


Figura 15. Análisis de la transducción tumoral de adenovirus transportado por un sistema celular en un modelo inmunizado de osteosarcoma canino. Células de la línea Abrams fueron implantados en ratones inmunodeficientes nu/nu. Los animales fueron inmunizados (imm) y el día 9 experimental fueron inyectados por vía sistémica con PBS o con una dosis única de AdTL desnudo (5×10^{10} vp/ratón) o de células tumorales D17 ó Abrams infectadas con AdTL (5×10^6 células/ratón). Setenta y dos horas tras la inyección, los animales fueron sacrificados y los tejidos tumorales fueron lisados con un tampón adecuado (CCLR). A partir de los extractos tisulares fueron determinados los niveles de expresión de luciferasa y de la cantidad de proteína. Los resultados se muestran en RLU (Light Units/ mg de proteína). * $p < 0.05$, estadísticamente significativo comparado con el grupo inyectado con PBS; # $p < 0.05$, estadísticamente significativo comparado con el grupo no inmunizado que fue inyectado con AdTL desnudo.

Estos resultados confirmaron que la presencia de una respuesta inmune preexistente es un problema relevante para la administración sistémica de la viroterapia oncolítica. La neutralización del virus por los anticuerpos disminuyó la dosis terapéutica viral administrada, capaz de infectar y lisar a la célula diana. Por el contrario, las células transportadoras protegieron al virus del efecto inhibitorio de los anticuerpos neutralizantes. Asimismo, las células transportadoras tumorales fueron capaces de transferir efectivamente la infección a la célula diana independientemente de la presencia de una respuesta inmune preexistente.

Tabla 10. Beneficio de la estrategia terapéutica en la llegada de virus a tejidos/órganos

	Ratios		
	Pulmón	Hígado	Tumor
AdTL/D17	1.62x	9103.03x	4.42x
AdTL/Abrams	0.05x	10970.74x	2.61x
D17/Abrams	0.03x	1.21x	0.59x
AdTL-imm/D17-imm	1.07x	19.22x	2.36x
AdTL-imm/Abrams-imm	0.26x	19.52x	1.53x
D17-imm/Abrams-imm	0.24x	1.02x	0.65x

* Imm, inmunización.

2.2. ANÁLISIS DE LA EFICACIA ANTITUMORAL *IN VIVO* DE LAS CÉLULAS TUMORALES CANINAS INFECTADAS CON OCCAV

Una vez demostrado el transporte sistémico efectivo de adenovirus utilizando células tumorales caninas como vehículos transportadores al tumor en presencia de una respuesta inmune preexistente, el siguiente paso fue evaluar la actividad antitumoral de esta aproximación terapéutica. Utilizando diferentes protocolos de administración, la efectividad antitumoral se evaluó en un principio en modelos xenoinjertados murinos inmunodeprimidos y posteriormente en un modelo inmunizado. Finalmente, el efecto de la inmunosupresión con ciclofosfamida fue estudiada como ventaja para la extensión del virus dentro del tumor.

2.2.1 Análisis de la expresión de osteocalcina en tumores xenoinjertados de células abrams

Debido a que la replicación de OCCAV se encuentra restringida a líneas celulares de osteosarcoma caninas y que el promotor de osteocalcina es activo en tumores primarios de osteosarcoma (Hemminki et al., 2003), se estudió la expresión de osteocalcina en tumores xenoinjertados de osteosarcoma que se utilizaron para evaluar la eficacia oncolítica mediada por células.

El análisis de la expresión de osteocalcina se realizó por inmunohistoquímica en tumores de la línea celular Abrams conservados en parafina. Tumores xenoinjertados de la línea tumoral A549 de adenocarcinoma pulmonar humano se utilizaron como control negativo. La osteocalcina se detectó con el anticuerpo primario OCG4 que dio precipitado marrón y los núcleos de las células por tinción con hematoxilina (coloración azul-lila). Como se observa en la figura 16, los

tumores de células Abrams presentaron una importante proporción de células positivas a la expresión de osteocalcina.

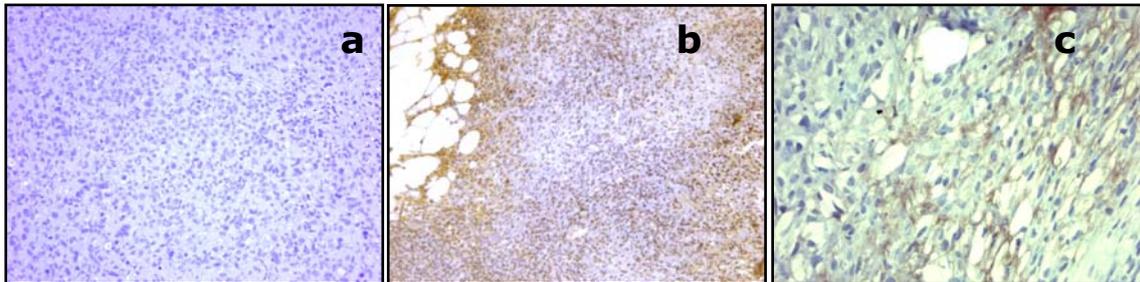


Figura 16. Análisis de la expresión de osteocalcina en tumores xenoinjertados de osteosarcoma canino. Análisis inmunohistoquímico de la presencia de osteocalcina en tumores xenoinjertados caninos conservados en parafina. La presencia de osteocalcina en tumores xenoinjertados de la línea tumoral A549 de adenocarcinoma pulmonar humano (**a**) y en la línea tumoral canina de osteosarcoma Abrams (**b y c**) se analizó por inmunohistoquímica y quedó representada con el marcaje de coloración marrón. Los núcleos de las células se tiñeron con hematoxilina (color azul-lila). Las fotografías muestran una ampliación por 20x (**a y b**) y 40x (**c**).

2.2.2 Análisis de la eficacia intratumoral de las células tumorales caninas infectadas con OCCAV

Inicialmente, con el objetivo de evaluar la eficacia terapéutica de las células tumorales como transportadoras de OCCAV *in vivo*, se comparó la actividad antitumoral de OCCAV desnudo (1×10^{10} vp/ratón) con OCCAV transportado por células D17 ó Abrams (2.5×10^6 cel/tumor) administradas por vía intratumoral.

2.2.2.1 Análisis de la eficacia intratumoral de las células tumorales caninas infectadas con OCCAV a dosis única

Ratones inmunodeprimidos con tumores subcutáneos de osteosarcoma canino Abrams se inyectaron con PBS o con células D17 ó Abrams infectadas con OCCAV. La administración se realizó por una inyección única intratumoral en diferentes puntos del tumor (Fig. 17A).

Como se muestra en la figura 17B, al final del experimento que correspondió al día 31 p.i no se detectó ningún efecto en la actividad antitumoral entre los

grupos inyectados con células y el grupo control, indicando que este protocolo de administración no tenía ningún efecto terapéutico.

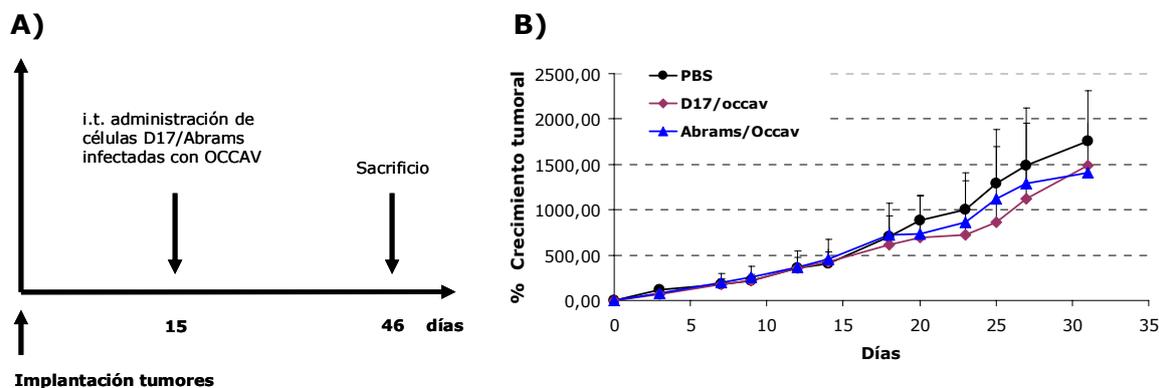


Figura 17. Análisis de la actividad antitumoral de las células tumorales caninas infectadas con OCCAV en un modelo xenoinjertado de osteosarcoma canino. (A) Representación esquemática del protocolo utilizado para evaluar la actividad antitumoral *in vivo* del sistema de transporte celular cargado con OCCAV. Ratones inmunodeficientes nu/nu con tumores subcutáneos de la línea Abrams (n= 10-12 tumores por grupo) fueron randomizados y tratados con una única inyección intratumoral de PBS o de células D17 ó Abrams infectadas con OCCAV (2.5×10^6 cel/tumor). (B) La gráfica muestra la media del crecimiento de los tumores de cada grupo respecto al día 0, en función del tiempo tras la administración. El volumen tumoral se determinó cada 2-3 días. Los resultados se presentan como la media \pm S.E. S.E. Error estándar

2.2.2.2 Análisis de la eficacia intratumoral de las células tumorales caninas infectadas con OCCAV a dosis múltiple

Ratones inmunodeprimidos con tumores subcutáneos de osteosarcoma canino Abrams se inyectaron con PBS, OCCAV desnudo o con células D17 ó Abrams infectadas con OCCAV. La administración se realizó por inyecciones intratumorales durante 3 días consecutivos en diferentes puntos del tumor (Fig. 18A).

Como se muestra en la figura 18B, al final del experimento que correspondió al día 42 p.i el porcentaje de crecimiento tumoral (respecto al día 0) de los tumores tratados con OCCAV desnudo fue 36% inferior comparado con los tumores tratados con PBS. La aproximación terapéutica de las células tumorales infectadas con OCCAV mostró mejores resultados respecto a los tratados con PBS, siendo el porcentaje de crecimiento tumoral un 77% inferior para las células transportadoras D17 y un 76% inferior para las células transportadoras Abrams. Las diferencias entre los porcentaje de crecimiento de los tumores tratados con las células

infectadas con OCCAV o PBS fueron significativas a partir del día 30 ([#] $p < 0.05$). Asimismo, la aproximación terapéutica de células infectadas con OCCAV también mostró una mejora significativa, a partir del día 33, respecto a OCCAV desnudo. El porcentaje de crecimiento de los tumores tratados con las células D17 ó Abrams infectadas con OCCAV fue un 49% inferior -para ambas células- comparado al virus solo. Además, es importante de destacar que en el grupo de ratones tratados con las células D17 infectadas con OCCAV, 3 de 10 tumores, presentaron una regresión completa.

Para analizar si el menor crecimiento de los tumores de los grupos tratados con las células tumorales infectadas con OCCAV se debía a la replicación del virus en el tumor, se evaluó la presencia de focos de replicación viral en los tumores extraídos 15 días después de la administración de la terapia. A través del análisis inmunohistoquímico de las secciones tumorales con un anticuerpo anti-adenovirus, se detectaron focos de infección adenoviral en los tumores tratados con células D17 infectadas con OCCAV. Por el contrario, en los tumores tratados con OCCAV desnudo no se detectaron focos de replicación. La figura 18C muestra la presencia de un foco de replicación de OCCAV transportado vía células D17.

2.2.3 Análisis de la eficacia sistémica de las células tumorales caninas infectadas con OCCAV

A continuación se analizó la eficacia terapéutica de las células tumorales infectadas con OCCAV por administración sistémica. Ratones inmunodeficientes nu/nu con tumores subcutáneos de células Abrams fueron inyectados con células D17 ó Abrams infectadas con OCCAV (5×10^6 cel/ratón). Una mezcla homogénea de ambas células infectadas con OCCAV (mix) (5×10^6 cel/ratón) también fue inyectada para evaluar si se lograba un aumento de la potencia oncolítica (Fig. 19A).

En tumores subcutáneos Abrams, el sistema celular D17 cargado con OCCAV demostró un mayor control del crecimiento tumoral. A partir del día 12 post-administración, la línea tumoral D17 infectada con OCCAV controló el crecimiento tumoral más eficientemente que el PBS ($*p < 0.05$) y, a partir del día 18 post-administración, que la línea tumoral Abrams infectada con OCCAV ([#] $p < 0.05$). Asimismo, al final del experimento (día 23 p.i) los resultados mostraron un menor crecimiento de los tumores tratados con la mezcla celular respecto a los tratados con PBS ($& p < 0.05$), pero sin un beneficio respecto a los tratados con las células D17. Después de 23 días de la administración de la terapia, los ratones tratados

con PBS se sacrificaron debido a un crecimiento incontrolado de los tumores (media volumen tumoral=1233 mm³). En este mismo punto, la media del volumen de los tumores tratados con las células D17 infectadas con OCCAV fue de 568 mm³, mientras que los tumores que habían recibido la administración de células Abrams infectadas con OCCAV era de 875 mm³ y de los tratados con la mezcla celular infectada con OCCAV era de 759 mm³ (Fig. 19B).

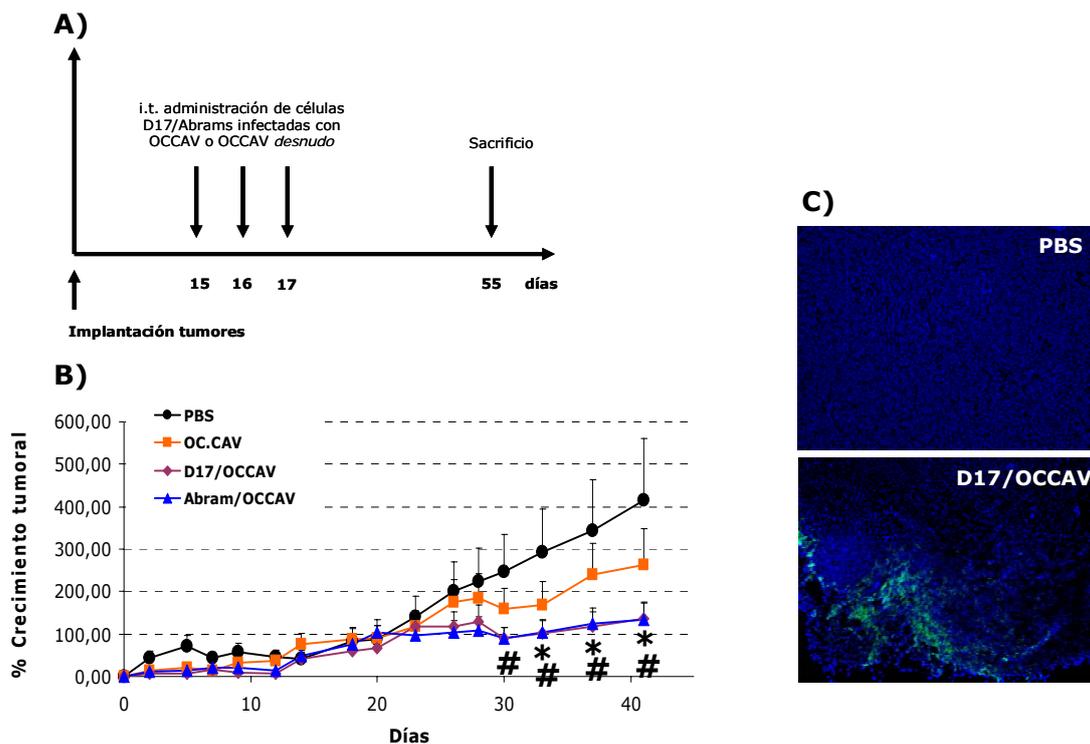


Figura 18. Análisis de la actividad antitumoral de las células tumorales caninas infectadas con OCCAV y de OCCAV desnudo en un modelo xenoinjertado de osteosarcoma canino. (A) Representación esquemática del protocolo utilizado para evaluar la actividad antitumoral *in vivo* del sistema de transporte celular cargado con OCCAV y de OCCAV desnudo. Ratones inmunodeficientes nu/nu con tumores subcutáneos de la línea Abrams (n= 10-12 tumores por grupo) fueron randomizados y tratados con tres inyecciones seguidas por vía intratumoral de PBS o de OCCAV desnudo (1×10^{10} vp/tumor) o de células D17 ó Abrams infectadas con OCCAV (2.5×10^6 cel/tumor). **(B)** La gráfica muestra la media del crecimiento de los tumores de cada grupo respecto al día 0, en función del tiempo tras la administración. El volumen tumoral se determinó cada 2-3 días. Los resultados se presentan como la media \pm S.E. * $p < 0.05$ comparando grupo células D17/OCCAV respecto a PBS ($p = 0.045$). # $p < 0.05$ comparando grupo células Abrams/OCCAV respecto a PBS ($p = 0.042$) y a OCCAV desnudo ($p = 0.02$). S.E. Error estándar. **(C)** Detección inmunohistoquímica de OCCAV en los tumores Abrams inyectados con las células tumorales D17 cargadas con OCCAV. La presencia del adenovirus canino en tumores extraídos 15 días tras la administración se detectó por inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-adenoviral y la detección de los núcleos de las células tumorales se realizó por tinción con DAPI. Las fotografías presentan una ampliación 10X.

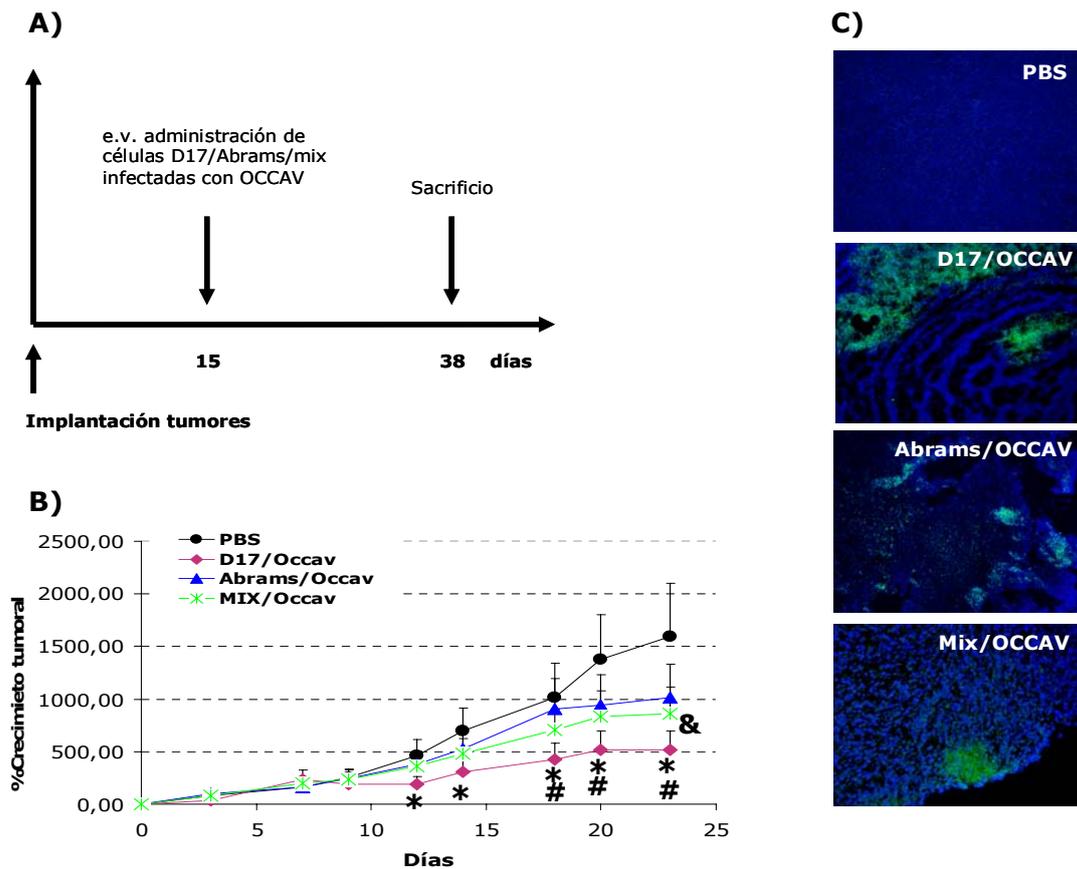


Figura 19. Análisis de la actividad antitumoral de las células tumorales caninas infectadas con OCCAV administradas por vía sistémica en un modelo xenoinjertado de osteosarcoma canino. (A) Representación esquemática del protocolo utilizado para evaluar la actividad antitumoral *in vivo* del sistema de transporte celular cargado con OCCAV y de OCCAV desnudo. R ratones inmunodeficientes nu/nu con tumores subcutáneos de la línea Abrams (n= 10-12 tumores por grupo) fueron randomizados y tratados con una inyección sistémica de PBS o de células D17, Abrams o una mezcla homogénea de ambas infectadas con OCCAV (5×10^6 cel/ratón). (B) La gráfica muestra la media del crecimiento de los tumores de cada grupo respecto al día 0, en función del tiempo post-administración. El volumen tumoral se determinó cada 2-3 días. Los resultados se presentan como la media \pm S.E. * significativo respecto a PBS ($p=0.002$). # significativo respecto a grupo de células Abrams/OCCAV ($p=0.039$). & significativo respecto a PBS ($p=0.024$). S.E. Error estándar. (C) Detección inmunohistoquímica de OCCAV en los tumores Abrams. La presencia del adenovirus canino en tumores extraídos 15 días posteriores a la administración se detectó por inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-adenoviral y la detección de los núcleos de las células tumorales se realizó por tinción con DAPI. Las fotografías presentan una ampliación 40X (PBS, D17/OCCAV y Abrams/OCCAV) y 200X (Mix/OCCAV).

Para comprobar si el control del crecimiento de los tumores de los grupos tratados con las células tumorales infectadas con OCCAV se debía a la replicación del virus en el tumor, se evaluó la presencia de focos de replicación viral en los tumores extraídos 15 días después de la administración de la terapia. A través del análisis inmunohistoquímico de las secciones tumorales con un anticuerpo anti-adenovirus se detectaron focos de infección adenoviral en los tumores tratados con las células tumorales infectadas con OCCAV. Todos los tumores tratados con las células D17 contenían grandes áreas necróticas, alrededor de las cuales se encontraban focos de replicación viral (Fig. 19C).

2.2.4 Efecto de la inmunización en la actividad antitumoral de las células tumorales D17 infectadas con OCCAV respecto a OCCAV desnudo

Una vez determinado el efectivo transporte sistémico utilizando las células transportadoras caninas y la actividad antitumoral en la administración sistémica de las células D17 infectadas con OCCAV, el siguiente paso fue analizar la potencia antitumoral de las células D17 infectadas con OCCAV respecto a OCCAV desnudo en un modelo xenoinjertado de osteosarcoma inmunizado.

Tumores de células Abrams fueron implantados subcutáneamente en ratones inmunodeficientes nu/nu y, posteriormente, la mitad de los ratones fueron inmunizados por inyección intraperitoneal de OCCAV a una dosis de 2.5×10^{10} vp/ratón. El día 22 experimental, los ratones fueron randomizados e inyectados sistémicamente con PBS, OCCAV desnudo (5×10^{10} vp/ratón) o células D17 infectadas con OCCAV (5×10^6 cel/ratón), tanto en los grupos de animales inmunizados como en los no inmunizados (Fig. 20A).

La determinación de los niveles de anticuerpos neutralizantes se realizó a partir de los sueros obtenidos de los seis grupos de ratones, a tiempo final del experimento. Como se observa en la figura 20B, en los animales inmunizados el grupo control presentó una mediana de título de anticuerpos neutralizantes (Nab's) de 1:80, el grupo OCCAV desnudo de 1:320 y el grupo de células D17 infectadas con OCCAV de 1:80. En los grupos de ratones no inmunizados, los títulos de Nab's fueron inferiores comparado con sus respectivos grupos inmunizados. En el grupo control los Nab's fueron indetectables, mientras que en los ratones tratados con OCCAV desnudo el título de anticuerpos fue de 1:80 y en el grupo de ratones inyectados con las células D17 infectadas con OCCAV fue de 1:20.

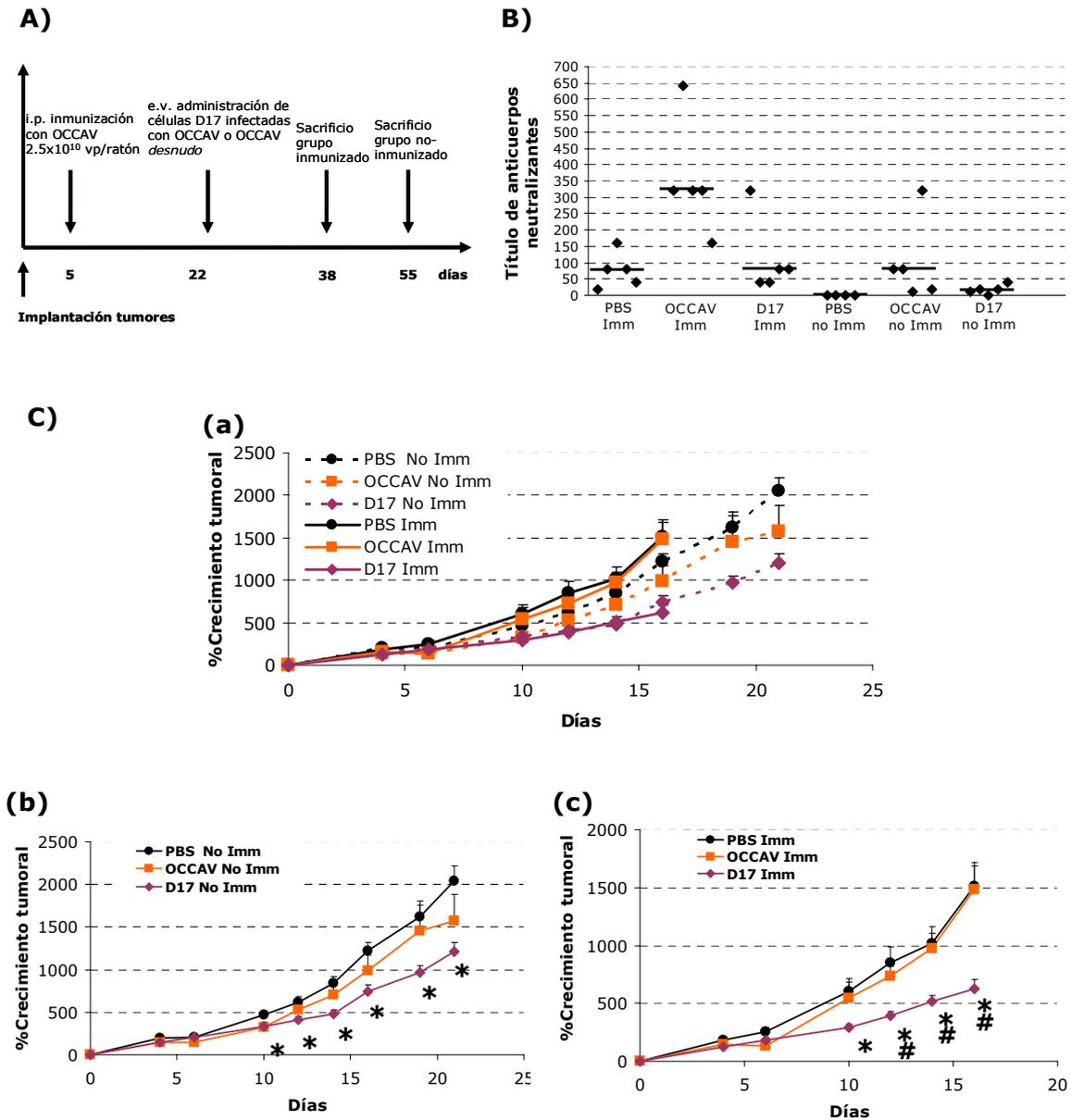


Figura 20. Análisis de la actividad antitumoral de las células tumorales D17 infectadas con OCCAV respecto a OCCAV desnudo en un modelo inmunizado xenoinjertado de osteosarcoma. (A) Representación esquemática del protocolo utilizado para evaluar la actividad antitumoral *in vivo* de las células D17 infectadas con OCCAV y de OCCAV desnudo en presencia de una respuesta inmune preexistente. Ratones inmunodeficientes nu/nu con y sin inmunización con tumores subcutáneos de la línea Abrams ($n = 10-12$ tumores por grupo) fueron tratados con una inyección única sistémica de PBS, células D17 infectadas con OCCAV o de OCCAV desnudo. **(B)** Título de anticuerpos neutralizantes. Los valores representan la media de triplicados. La línea negra representa la mediana para cada grupo. **(C) (a)** Eficacia antitumoral del sistema de transporte mediado por células en ratones no inmunizados (no-imm) e inmunizados (imm). La misma gráfica representada por grupos: **(b)** no inmunizados e **(c)** inmunizados. La gráfica muestra la media del crecimiento de los tumores de cada grupo respecto al día 0, en función del tiempo post-administración. Los resultados se presentan como la media \pm S.E. * significativo respecto a PBS ($p < 0.05$). # Significativo respecto a OCCAV desnudo ($p < 0.05$). S.E. Error estándar.

El análisis de la potencia antitumoral sistémica nos demostró nuevamente la mayor actividad oncolítica de las células D17 infectadas con OCCAV, incluso en presencia de una respuesta inmune preexistente (Fig. 20Ca). Como se observa en la figura 20Cb, en ratones no inmunizados la aproximación terapéutica de las células D17 infectadas con OCCAV mostró una mejora significativa respecto a los tratados con PBS ($p < 0.002$) a partir del día 9 post-administración, siendo el porcentaje de crecimiento tumoral un 41% inferior. Comparado con los tumores tratados con el OCCAV desnudo, el porcentaje de crecimiento fue inferior en un 23%, aunque las diferencias no fueron significativas. Entre los grupos inyectados con PBS u OCCAV desnudo no se detectaron diferencias significativas en el volumen tumoral.

En los animales inmunizados (Fig. 20Cc), los tumores tratados con células D17 infectadas con OCCAV demostraron controlar el crecimiento tumoral más eficientemente que el OCCAV desnudo ($p < 0.003$) y que el grupo tratado con PBS ($p < 0.004$). El porcentaje de crecimiento de los tumores inyectados con células D17 fue un 59 y 58% inferior respecto al grupo control y al grupo OCCAV desnudo, respectivamente. Al final del experimento que correspondió al día 16 p.i, los volúmenes tumorales de los grupos PBS y OCCAV desnudo fueron prácticamente iguales.

Entre los animales inmunizados y los no inmunizados no se observaron diferencias en la actividad antitumoral de las células D17. Aunque el crecimiento de los tumores tratados con OCCAV desnudo no fue inhibido en ninguno de los dos grupos de animales, el crecimiento tumoral en los ratones no inmunizados estuvo retrasado respecto a los que sí fueron inmunizados, indicando que los anticuerpos neutralizantes reducen el efecto oncolítico de OCCAV.

Para comprobar si el control del crecimiento de los tumores tratados con las células tumorales infectadas con OCCAV se debió a la replicación del virus en el tumor, se evaluó la presencia de focos de replicación viral en los tumores extraídos 13 días post-administración de la terapia. A través del análisis inmunohistoquímico de las secciones tumorales con un anticuerpo anti-adenovirus, se detectaron focos de infección adenoviral en los tumores tratados tanto con el virus desnudo como los tratados con células D17 infectadas con OCCAV en ratones inmunizados y en los no inmunizados (Fig. 21). Sin embargo, en los tumores tratados con el sistema celular se observó una mayor infección del tejido tumoral y con una distribución más homogénea dentro del parénquima del tumor.

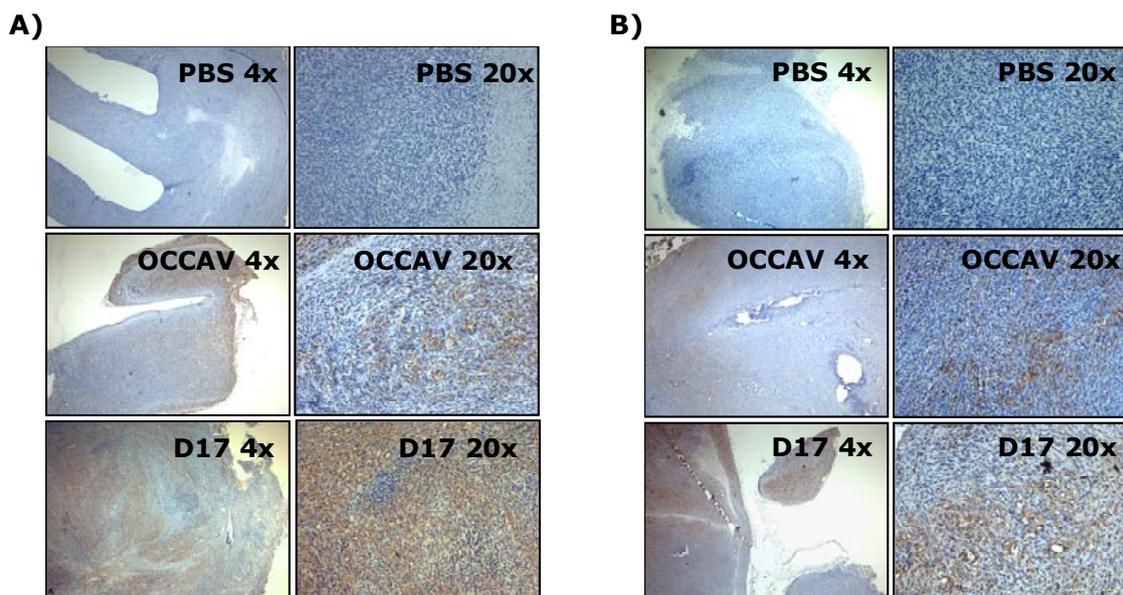


Figura 21. Análisis inmunohistoquímico de OCCAV en tumores Abrams. Inmunohistoquímica anti-adenovirus en tumores xenoinjertados de células Abrams obtenidos 13 días posteriores a la administración sistémica de PBS, OCCAV desnudo y células D17 infectadas con OCCAV. Cortes de tejidos parafinados fueron incubados con un anticuerpo anti-adenovirus y contrastados con hematoxilina. **A)** Análisis inmunohistoquímico de tumores xenoinjertados en animales inmunodeficientes. **B)** Análisis inmunohistoquímico de tumores xenoinjertados en animales inmunizados.

Estos resultados demostraron que consistentemente a lo observado en el transporte de adenovirus solo en ratones inmunizados, el OCCAV desnudo no muestra una respuesta terapéutica, alcanzando volúmenes tumorales similares dentro del mismo período de tiempo a los del PBS. Sin embargo, la administración del sistema de transporte mediado por células y su eficacia antitumoral no se ve afectada por la presencia de anticuerpos neutralizantes anti-CAV2.

2.2.5 Efecto de la inmunosupresión con ciclofosfamida en la actividad antitumoral de las células tumorales D17 infectadas con OCCAV respecto a OCCAV desnudo

Previamente ha sido descrito que la inmunosupresión aumenta la replicación del adenovirus salvaje y la eficacia de los vectores oncolíticos *in vivo*. La ciclofosfamida (CPA) ha sido evaluada como agente inmunosupresor en el contexto de la expresión de transgenes utilizando vectores adenovirales en modelos murinos, donde se observó que la inmunosupresión provocada por la ciclofosfamida no sólo prolongaba la expresión del transgen, si no que también suprimía las funciones de los linfocitos T citotóxicos (CTL) y de los linfocitos T *Helper*, así como

también prevenía la formación de anticuerpos neutralizantes anti-adenovirus, además de permitir la re-administración satisfactoria del vector (Jooss et al., 1996; Smith et al., 1996).

A partir de esta evidencia, el siguiente paso fue evaluar si la potencia oncolítica de las células tumorales D17 infectadas con OCCAV podía ser aumentada en ratones inmunosuprimidos con ciclofosfamida.

Tumores de células Abrams fueron implantados subcutáneamente en ratones inmunodeficientes nu/nu y posteriormente la mitad de los ratones fueron inmunizados por inyección intraperitoneal de OCCAV a una dosis de 2.5×10^{10} vp/ratón. El día 15 experimental, se inició el protocolo de inmunosupresión con ciclofosfamida. Durante la primera semana se administró una dosis única de 250 mg/Kg intraperitoneal y a partir de la segunda semana una dosis de 50 mg/kg intraperitoneal dos veces a la semana durante 19 días. El día 22 experimental, los ratones fueron randomizados e inyectados sistémicamente con PBS, OCCAV desnudo (5×10^{10} vp/ratón) o células D17 infectadas con OCCAV (5×10^6 cel/ratón), tanto en los grupos de animales inmunizados más ciclofosfamida como en los no inmunizados más ciclofosfamida (Fig. 22A).

La determinación de los niveles de anticuerpos neutralizantes se realizó a partir de los sueros obtenidos de los seis grupos de ratones, a tiempo final del experimento. Como se observa en la figura 22B, en los animales inmunizados más ciclofosfamida, el grupo control presentó niveles indetectables de anticuerpos neutralizantes, el grupo OCCAV desnudo de 1:10 y el grupo de células D17-OCCAV de 1:5. En los grupos de ratones no inmunizados más ciclofosfamida, los títulos de anticuerpos neutralizantes (NAB's) en el grupo control y en el grupo de ratones inyectados con las células D17-OCCAV fueron indetectables, mientras que en los ratones tratados con el OCCAV desnudo el título de anticuerpos fue de 1:10.

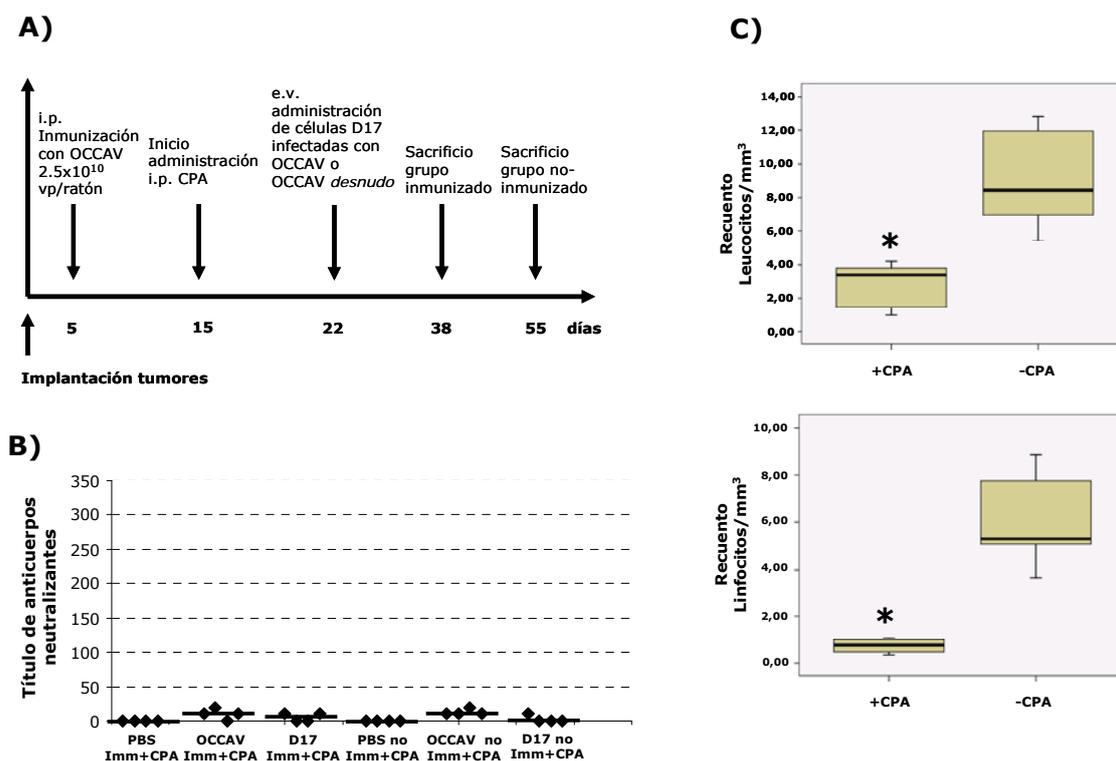


Figura 22. Evaluación del efecto inmunosupresor de la ciclofosfamida (CPA) en la respuesta de los anticuerpos neutralizantes y en el recuento leucocitario en un modelo inmunizado xenoinjertado de osteosarcoma canino. (A) Representación esquemática del protocolo utilizado para evaluar la actividad antitumoral *in vivo* de las células D17 infectadas con OCCAV y de OCCAV desnudo, en presencia de anticuerpos neutralizantes más inmunosupresión con CPA. Ratones inmunodeficientes nu/nu con tumores subcutáneos de la línea Abrams ($n= 10-12$ tumores por grupo) fueron inmunizados (imm) con OCCAV (2.5×10^{10} vp/ratón i.p.). El día 15 experimental, todos los animales iniciaron un tratamiento con CPA que fue administrado dos veces a la semana. Los ratones fueron tratados con una inyección única sistémica de PBS, células D17 infectadas con OCCAV (5×10^6 células/ratón) o de OCCAV desnudo (5×10^{10} vp/ratón). (B) Título de anticuerpos neutralizantes. Los títulos de anticuerpos neutralizantes se determinaron por la mayor dilución de suero que resulta en al menos el 50% de inhibición de la infección cuando se incuban con 1×10^4 vp de CAV-GFP. Los valores representan la media de triplicados. La línea negra representa la mediana para cada grupo. (C) Recuento de leucocitos y linfocitos. Diez días tras la inmunización, los ratones fueron inmunosuprimidos con CPA. Muestras de sangre fueron coleccionadas al momento del sacrificio para evaluación del diferencial leucocitario. * $p < 0.05$.

La evaluación de la inmunosupresión con ciclofosfamida se determinó a través del análisis del hemograma. El recuento leucocitario total y su diferencial celular confirmaron la inmunosupresión de los ratones inmunizados. La figura 22C muestra que al final del experimento el recuento leucocitario total y el recuento de linfocitos de los animales inyectados con ciclofosfamida presentaron niveles significativamente inferiores respecto a los que no fueron inmunosuprimidos (leucocitos $p < 0.002$ y linfocitos $p < 0.001$). El recuento leucocitario para los ratones

inmunizados fue de 8.99×10^3 cel/ μ l y para los inmunizados más ciclofosfamida fue de 2.87×10^3 cel/ μ l. El recuento de linfocitos para los ratones inmunizados fue de 5.98×10^3 cel/ μ l y para los inmunizados más ciclofosfamida fue de 0.74×10^3 cel/ μ l.

Consecuentemente con los resultados anteriores, el análisis de la potencia antitumoral muestra que en ratones no inmunizados inmunosuprimidos con ciclofosfamida las células D17 infectadas con OCCAV presentaron una mayor capacidad oncolítica respecto al control y a OCCAV desnudo y, que la administración sistémica del vector desnudo no mostró ningún beneficio terapéutico (Fig. 23A). En ratones no inmunizados más ciclofosfamida, a tiempo final del experimento (día 29 p.i), los tumores tratados con las células D17 infectadas con OCCAV presentaron un porcentaje de crecimiento tumoral 52% inferior que los tumores controles ($p < 0.019$) y, aunque se observó un claro enlentecimiento del crecimiento tumoral respecto a OCCAV desnudo, las diferencias en el porcentaje de crecimiento tumoral entre ambos grupos no fueron significativas. A día 29 post-inyección, los volúmenes de los tumores inyectados con PBS era de 608 mm^3 , de OCCAV desnudo de 512 mm^3 y de células D17 infectadas con OCCAV de 326 mm^3 .

En animales inmunizados, la inmunomodulación con ciclofosfamida otorgó un beneficio a la administración de OCCAV desnudo, desde el día 15 post-inyección y hasta el final del experimento (día 29 p.i). Como se muestra en la figura 23B, los tumores tratados con OCCAV desnudo presentaron un crecimiento tumoral 45% inferior respecto a los controles ($p < 0.02$) y con un volumen final similar a los tratados con las células D17 infectadas con OCCAV (411 y 344 mm^3 , respectivamente).

La clara potencia oncolítica que han demostrado las células D17 infectadas con OCCAV no se vio mejorada con la inmunosupresión. Sin embargo, al igual a los resultados previamente observados, desde día 12 post-administración los tumores tratados con las células D17 presentaron un porcentaje de crecimiento tumoral 55% inferior respecto al control ($p < 0.025$).

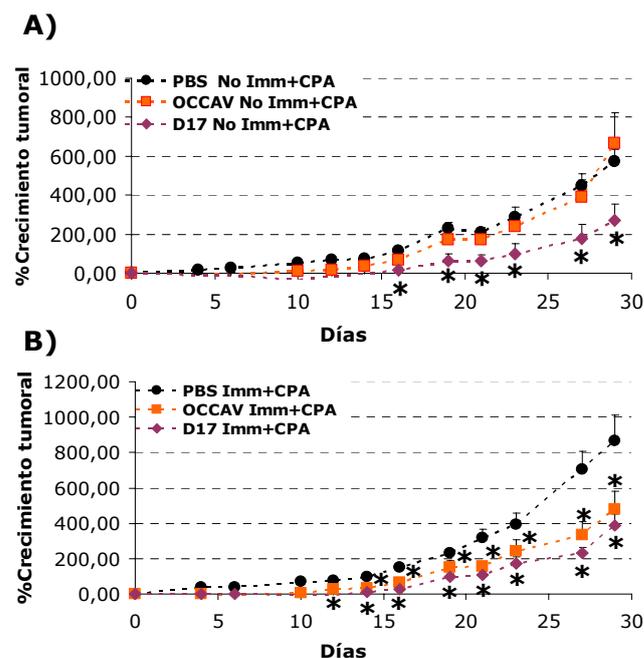


Figura 23. Análisis de la actividad antitumoral de las células tumorales D17 infectadas con OCCAV respecto a OCCAV desnudo en un modelo xenoinjertado de osteosarcoma preinmunizado mas ciclofosfamida. Eficacia antitumoral del sistema celular en ratones inmunodeficientes **(A)** o inmunizados **(imm)** **(B)** inmunosuprimidos con ciclofosfamida. La gráfica muestra la media del crecimiento de los tumores de cada grupo respecto al día 0, en función del tiempo post-administración. Los resultados se presentan como la media \pm S.E. * $p < 0.05$ significativo respecto a PBS.

* La determinación del efecto de la inmunosupresión con ciclofosfamida en la actividad antitumoral del sistema celular cargado con virus fue realizado simultáneamente en ratones no inmunizados e inmunizados. Las gráficas se muestran por separado sólo en términos didácticos.

Para comprobar si el control del crecimiento de los tumores tratados con las células tumorales infectadas con OCCAV u OCCAV desnudo se debía a la replicación del virus en el tumor, se evaluó la presencia de focos de replicación viral en los tumores extraídos 13 días post-administración de la terapia. A través del análisis inmunohistoquímico de tumores parafinados, las secciones tumorales fueron analizadas con un anticuerpo anti-adenovirus. En las muestras analizadas se detectaron focos de infección adenoviral en todos los grupos que recibieron terapia, incluso en las secciones tumorales de los animales no inmunizados más ciclofosfamida que se inyectaron con OCCAV desnudo (Fig. 24). La detección del adenovirus canino en muestras de tumores de los ratones inmunosuprimidos con ciclofosfamida presentaron en general focos de replicación viral de mayor extensión respecto a los ratones que no recibieron ciclofosfamida.

Estos resultados sugieren que bajo condiciones inmunosupresoras, el OCCAV desnudo es igualmente efectivo en suprimir el crecimiento tumoral que las células tumorales D17 infectadas con OCCAV.

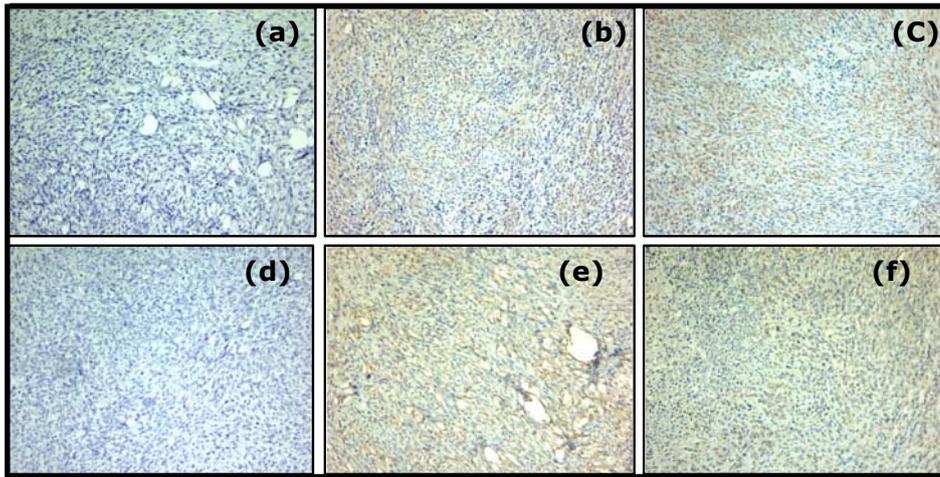


Figura 24. Detección inmunohistoquímica de OCCAV en muestras de tumores Abrams inyectados con células D17 cargadas con OCCAV en un modelo xenoinjertado de osteosarcoma canino inmunosuprimido con ciclofosfamida. Inmunohistoquímica anti-adenovirus en tumores xenoinjertados de células Abrams obtenidos 13 días tras la administración sistémica de PBS, OCCAV desnudo y células D17 infectadas con OCCAV. Cortes de tejidos parafinados fueron incubados con un anticuerpo anti-adenovirus y contrastados con hematoxilina. Panel superior: tumores de ratones no inmunizados inmunosuprimidos con ciclofosfamida. **(a)** PBS, **(b)** D17 infectadas con OCCAV y **(c)** OCCAV desnudo. Panel inferior: tumores de ratones inmunizados inmunosuprimidos con ciclofosfamida. **(d)** PBS, **(e)** D17 infectadas con OCCAV y **(f)** OCCAV desnudo. La detección inmunohistoquímica de adenovirus queda representada con un marcaje de coloración marrón. Las fotografías presentan una ampliación 10X.

3. ESTUDIO PRELIMINAR DE TOXICIDAD Y LIBERACIÓN EN PERROS CON OSTEOSARCOMA INYECTADOS CON CÉLULAS TUMORALES INFECTADAS CON OCCAV

La razón para utilizar un sistema de células transportadoras en perros es principalmente evadir la neutralización por parte de los anticuerpos, el cual adquiere una gran importancia debido a los altos títulos de anticuerpos neutralizantes anti-CAV2 presentes principalmente por vacunación.

El foco de un estudio de toxicidad es definir los efectos adversos ocasionados por el virus sobre la fisiología de un paciente. Liberación viral (del inglés *shedding*) se define como la diseminación del virus a través de las secreciones y/o excreciones del paciente y su valoración se utiliza para entender el riesgo potencial asociado con la transmisión a terceras partes.

En este apartado, se analizan los resultados preliminares de toxicidad y liberación que se obtuvieron en dos perros con osteosarcoma espontáneo inyectados con una solución de células tumorales caninas infectadas con OCCAV por dos rutas diferentes: intratumoral y sistémica, con el objetivo de obtener los primeros datos para el diseño apropiado de un ensayo clínico fase I en pacientes caninos con osteosarcoma.

3.1 DATOS PRELIMINARES DE UN ESTUDIO DE TOXICIDAD Y LIBERACIÓN EN UN PERRO INYECTADO CON CÉLULAS TUMORALES CANINAS INFECTADAS CON OCCAV POR VÍA INTRATUMORAL

La terapia celular consistió en una solución homogénea de células tumorales de osteosarcoma caninas D17 y Abrams a una concentración de 3×10^8 células en un volumen de 5 ml de suero fisiológico. Las células fueron infectadas al 100% con OCCAV durante 4h y posteriormente irradiadas a una dosis de 30Gy. Se realizaron dos administraciones intratumorales separadas entre sí por 14 días. Las inyecciones fueron hechas en diferentes puntos del tumor. Durante las administraciones del tratamiento y hasta 16h posteriores, el paciente se mantuvo en confinamiento en la zona de pacientes infecciosos caninos del Hospital Clínico Veterinario, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona.

3.1.1 Características del paciente

El paciente canino enrolado en el estudio fue de raza Rottweiler, macho, de 7 años de edad. Con diagnóstico histopatológico de osteosarcoma osteoblástico apendicular en el radio proximal derecho. Todos sus parámetros clínico-fisiológicos, hematológicos y bioquímicos se encontraron normales al momento del inicio de la terapia, sin evidencias de tener alguna patología asociada.

3.1.1.1 Análisis de la expresión de osteocalcina

El análisis de la expresión de osteocalcina se realizó por inmunohistoquímica en una muestra del tumor primario y como control negativo se utilizó una muestra de un tumor de hemangiosarcoma canino parafinada. La osteocalcina se detectó a través de un precipitado marrón y los núcleos de las células por tinción con hematoxilina. Como se observa en la figura 25, el tumor primario de osteosarcoma osteoblástico presentó una importante proporción de células positivas para la expresión de osteocalcina.

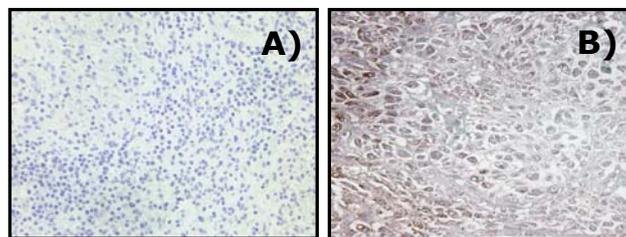


Figura 25. Análisis de la expresión de osteocalcina por las células tumorales de osteosarcoma canino. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de osteocalcina en tumores de osteosarcoma canino conservados en parafina. La expresión de osteocalcina queda representada con el marcaje de coloración marrón. Los núcleos de las células se tiñeron con hematoxilina (coloración azul-lila). **(A)** Muestras de un tumor de hemangiosarcoma canino. **(B)** Muestras de un tumor de osteosarcoma canino. Las fotografías presentan una amplificación por 40X.

3.1.2 Toxicidad relacionada al tratamiento

3.1.2.1 *Eventos clínicos adversos*

Durante la administración de la terapia y durante las 16h posteriores el paciente fue evaluado clínicamente. La inyección intratumoral fue bien tolerada y no se detectaron signos agudos de anafilaxis posterior a las inyecciones. La temperatura corporal, la frecuencia cardiaca y respiratoria nunca excedieron los niveles de normalidad. Sin embargo, a las 72h de la primera administración intratumoral de las células tumorales caninas infectadas con OCCAV, en la zona del tumor primario se generó una inflamación severa con gran edema de toda la extremidad. El estudio citológico determinó la presencia de abundantes polimorfonucleares neutrófilos, cambios celulares benignos, reactivos, asociados a inflamación inespecífica. La inflamación de la extremidad se resolvió parcialmente a los 7 días después de un tratamiento con anti-inflamatorios (Firocoxib 5mg/kg/24h) y diuréticos (Furosemida 1mg/kg/12h).

3.1.2.2 *Datos de laboratorio*

En el hemograma se observaron cambios hematológicos asintomáticos tras la administración del tratamiento (Fig. 26). El recuento de eritrocitos y la determinación del hematocrito y la hemoglobina se encontraron en todos los tiempos analizados bajo los rangos de normalidad. Catorce días después de la administración de la primera dosis de células tumorales infectadas con OCCAV, el recuento de plaquetas resultó aumentado. Asimismo, el análisis del leucograma nos mostró que en el mismo tiempo, el paciente cursó con leucocitosis por neutrofilia, sin otros signos/síntomas clínicos asociados.

Como se muestra en la tabla 11, en el análisis de la bioquímica sanguínea no se observaron cambios en los valores de la bilirrubina total, ALT, GGT, proteínas totales, creatinina, urea, calcio, potasio y fósforo en las muestras de suero obtenidas a tiempo basal y a día 7, 14 y 26 p.i. de la primera dosis de células tumorales infectadas con OCCAV. Sin embargo, la enzima fosfatasa alcalina, que tiene un valor pronóstico y de respuesta al tratamiento en el osteosarcoma canino, presentó una disminución temporal (sin alcanzar el rango de normalidad) respecto a los valores obtenidos antes del tratamiento.

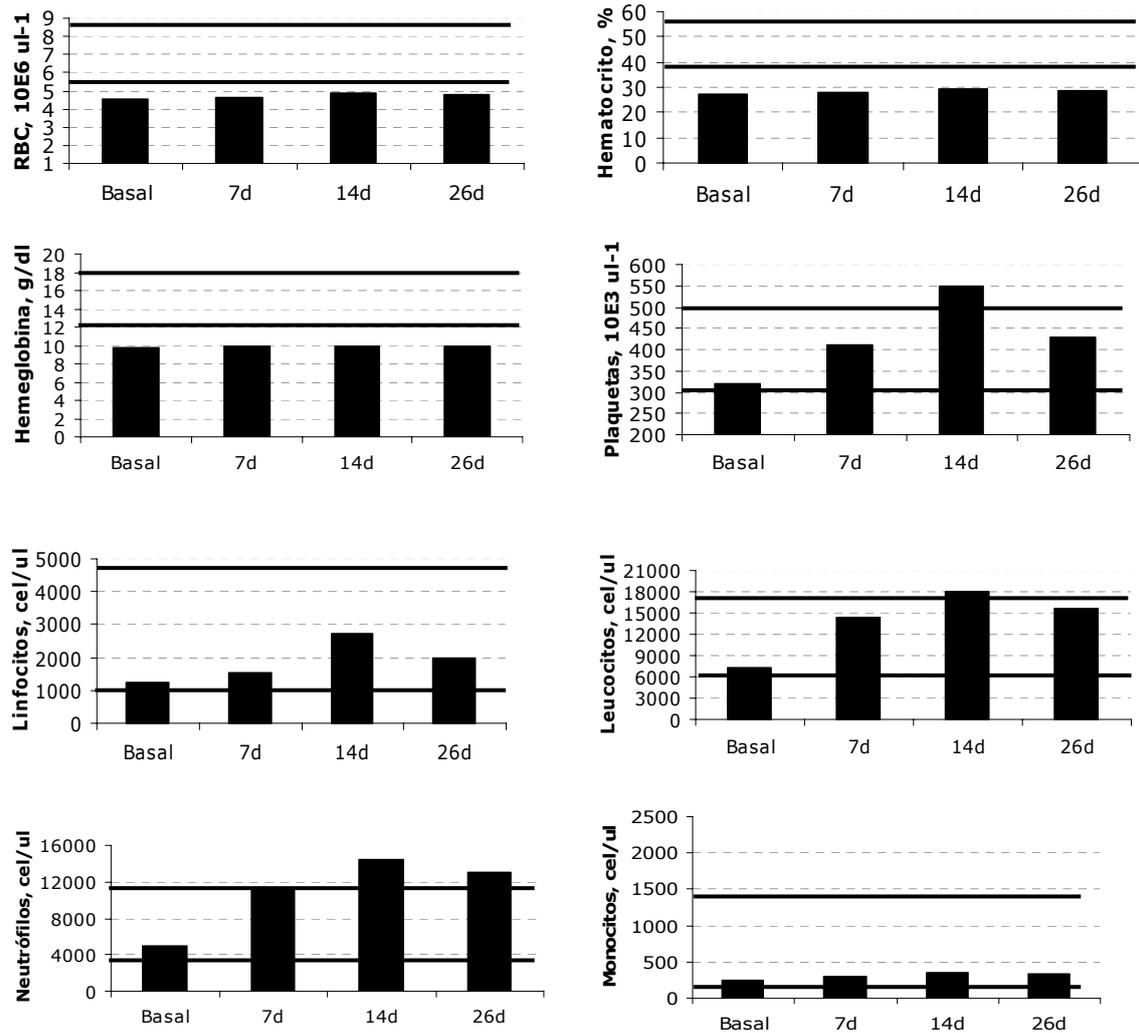


Figura 26. Perfil hematológico obtenido posterior a la administración intratumoral del sistema celular infectado con OCCAV. Después de la administración intratumoral de las células tumorales caninas infectadas con OCCAV (3×10^8 cel/perro) se obtuvieron muestras de sangre para su análisis hematológico a los 7d, 14d y 26 días después de la administración de la terapia. El hemograma fue analizado en el Servicio de Hematología Clínica Veterinaria, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona. Valores de referencia hematológicos (representados en las gráficas entre líneas negras): Recuento eritrocitos (RBC): 5.5-8.5 ($\times 10^6 \mu\text{l}^{-1}$); Hematocrito: 37-55 (%); Hemoglobina: 12-18 (g/dl); Plaquetas: 300-500 ($\times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$); Leucocitos: 6000-17000 (cel/ μl); Linfocitos: 1000-4800 (cel/ μl); Neutrófilos: 3000-11500 (cel/ μl); Monocitos: 150-1350 (cel/ μl).

Tabla 11. Perfil bioquímico sanguíneo posterior a la administración intratumoral de células tumorales caninas infectadas con OCCAV

Parámetros Bioquímicos	Basal	7d	14d	26d	Valores de Referencia
Bilirrubina Total, mg/dl	0.22	0.2	N/O	N/O	(0,1-0,5)
ALT, UI/L	23	21	19	19	(21-102)
GGT, UI/L	2	2	1	2	(1,2-6,4)
Fosfatasa Alcalina, UI/L	376.3	176.5	179.9	234.5	(20-156)
Proteínas Totales, g/dl	6.21	6.14	6.14	7.81	(5,4-7,1)
Creatinina, mg/dl	1.54	1.2	1.1	1.19	(0,5-1,5)
Urea, mg/dl	55.6	35.2	34.8	61.5	(21,4-59,9)
Calcio, md/dl	9.7	10	10	10.5	(9-11,3)
Potasio, mmol/L	4.98	4.96	5.3	4.82	(4,37-5,35)
Fósforo, mg/dl	5.25	5.25	5.25	5.77	(2,6-6,2)

* El perfil bioquímico fue analizado en el Servicio de Bioquímica Clínica Veterinaria, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona.

** N/O no obtenido

3.1.3 Determinación de los anticuerpos neutralizantes

El paciente presentó niveles de anticuerpos neutralizantes séricos antes del inicio de la terapia de 1:640, determinado por la mayor dilución de suero que resulta en al menos el 50% de inhibición de la infección cuando se incubaba con 1×10^6 vp de CAV-GFP. Como se muestra en la figura 27, desde el día 7 y hasta al menos el día 14 p.i. se detectaron títulos de anticuerpos neutralizantes en un alza progresiva y constante, alcanzando un título de 1:10240. Al final del estudio (día 26 p.i.) el paciente presentó un título de 1:10240.

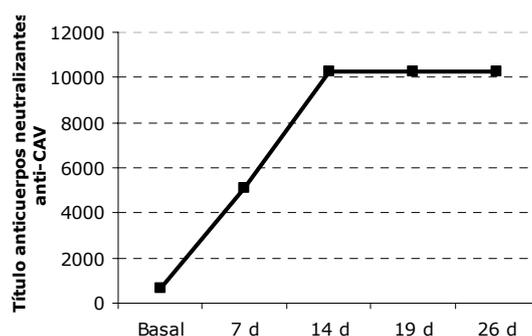


Fig. 27. Cinética del título de anticuerpos neutralizantes en un paciente canino inyectado por vía intratumoral con células tumorales infectadas con OCCAV. Muestras de suero se obtuvieron inmediatamente antes y a los 7d, 14d y 26d post-administración de la primera inyección intratumoral de células tumorales caninas infectadas con OCCAV (3×10^8 cel/perro). Las muestras fueron cuantificadas para la detección del título de anticuerpos neutralizantes presentes, determinados por la mayor dilución de suero que resultó en al menos el 50% de inhibición de la infección cuando se incubaron con 1×10^6 vp de CAV-GFP. Los valores representan la media de triplicados.

3.1.4 OCCAV en orina, saliva y sangre

La determinación de las partículas virales infectivas en las muestras biológicas secretadas/excretadas nos permitió valorar el riesgo potencial de transmisión del virus. Muestras de orina y saliva se obtuvieron del paciente a tiempo basal y a los días 7, 14 y 26 p.i. de la primera administración del tratamiento. Todas las muestras de orina y saliva analizadas en busca de evidencias de eliminación viral vía inmunotinción del hexón del adenovirus resultaron negativas en todos los tiempos analizados.

La determinación absoluta del número de genomas virales en sangre fue cuantificada por PCR a tiempo real, utilizando una sonda taqman y cebadores para detectar la región E1A de OCCAV. La cantidad de genomas virales detectados en sangre quedó bajo el límite de sensibilidad de la técnica, que corresponde a 10^2 genomas virales/ μ l.

3.1.5 Resultado de la necropsia

El paciente desarrolló aumento del dolor en la extremidad afectada, sintomatología respiratoria y deterioro grave de la condición física 24 días después del inicio del tratamiento. La enfermedad metastásica pulmonar fue diagnosticada radiográficamente y el paciente fue sacrificado a los 26 días tras la administración de la primera dosis de células tumorales infectadas con OCCAV. En la necropsia se encontró infiltración tumoral en la articulación húmero-radio-cubital y enfermedad metastásica extendida a pulmón y a linfonodo axilar. Otros hallazgos de interés fueron una hiperplasia reactiva linfoide esplénica y de los linfonodos pre-escapular y pancreático. La progresión de la enfermedad en este paciente fue atribuido al desarrollo mismo de la patología.

Para la detección de la distribución de OCCAV en los órganos caninos y la valoración de la infección viral en la célula diana, se realizaron PCR a tiempo real e inmunohistoquímicas en las muestras de órganos obtenidas en el momento de la necropsia y conservadas a -80°C .

La determinación absoluta del número de genomas virales en los tejidos analizados fue cuantificada por PCR a tiempo real, utilizando una sonda taqman y cebadores para detectar la región E1A de OCCAV. Como se muestra en la tabla 12, genomas virales fueron detectados, de mayor a menor cantidad, en muestras de

tumor, linfonodos axilares, bazo, hígado y riñón. No se detectaron genomas virales en pulmón y testículos.

Tabla 12. Determinación absoluta del número de genomas virales en muestras de órganos cuantificada por PCR a tiempo real, utilizando una sonda taqman y cebadores para detectar la región E1A de OCCAV

Órgano	Genomas de OCCAV/mg de tejido
Hígado	3400
Tumor	17061
Linfonódulos axilares	11976
Bazo	6911
Riñón	2000
Pulmón	N/D
Testículos	N/D

* La necropsia fue realizada en las instalaciones del Servicio de Diagnóstico de Patología Veterinaria, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona.

N/D no detectado

Para detectar la replicación viral en el tumor, se evaluó la presencia de focos de replicación viral en muestras del tumor primario con un anticuerpo anti-adenovirus. En las muestras analizadas, se detectaron focos de infección adenoviral (Fig. 28).

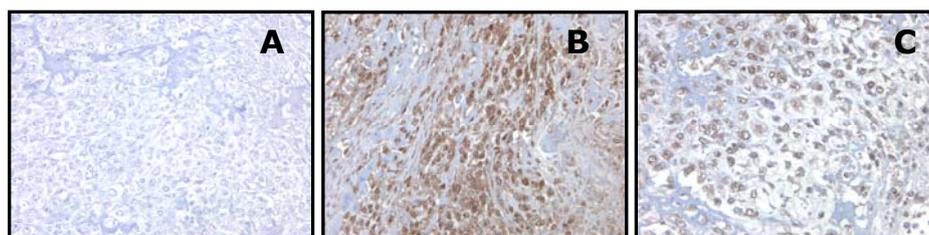


Figura 28. Análisis de la replicación viral en células del tumor primario de osteosarcoma canino inyectado por vía intratumoral con un sistema celular infectado con OCCAV (3×10^8 cel/perro). Inmunohistoquímica anti-adenovirus en muestra de tumor obtenida 26 días tras la administración de las células tumorales cargadas con OCCAV. Cortes de tejidos parafinados fueron incubados con un anticuerpo anti-adenovirus y contrastados con hematoxilina. **(A)** Control negativo. La fotografía presenta una ampliación 10X. **(B-C)** La detección inmunohistoquímica del adenovirus queda representada con un marcaje de coloración marrón. Las fotografías presentan una ampliación 10X **(B)** y 40X **(C)**.

3.2 DATOS PRELIMINARES DE UN ESTUDIO DE TOXICIDAD Y ELIMINACIÓN EN UN PERRO INYECTADO CON CÉLULAS TUMORALES CANINAS INFECTADAS CON OCCAV POR VÍA SISTÉMICA

La terapia celular consistió en una solución homogénea de células tumorales de osteosarcoma caninas D17 y Abrams a una concentración de 3×10^8 células en un volumen de 500 ml de suero fisiológico. Las células fueron infectadas al 100% con OCCAV durante 4h y posteriormente irradiadas a una dosis de 30Gy. La administración sistémica se realizó lentamente, evaluando constantemente los parámetros fisiológicos del paciente, a través de un filtro de 200 μm (para evitar agregados celulares) durante un período de tiempo de 45 minutos. Durante la administración del tratamiento y hasta 16h posteriores, el paciente se mantuvo en confinamiento en la zona de pacientes infecciosos caninos del Hospital Clínico Veterinario, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona.

3.2.1 Características del paciente

El paciente canino enrolado en el estudio fue de raza Dogo, macho, de 8 años de edad, con diagnóstico histopatológico de osteosarcoma teleangiectásico apendicular en la tibia distal derecha. El paciente fue sometido a una amputación de su extremidad el día antes de iniciar la terapia de acuerdo a indicación médica. Todos sus parámetros clínico-fisiológicos, hematológicos y bioquímicos se encontraron normales al momento del inicio de la terapia, sin evidencias de tener alguna patología asociada.

3.2.1.1 Análisis de la expresión de osteocalcina

El análisis de la expresión de osteocalcina se realizó por inmunohistoquímica en una muestra del tumor primario y como control negativo se utilizó una muestra de un tumor de hemangiosarcoma canino parafinado. La osteocalcina se detectó con un anticuerpo primario anti-osteocalcina OCG4, a través de un precipitado marrón y los núcleos de las células por tinción con hematoxilina. Como se observa en la figura 29, el tumor primario de osteosarcoma teleangiectásico presenta una importante proporción de células positivas a la expresión de osteocalcina.

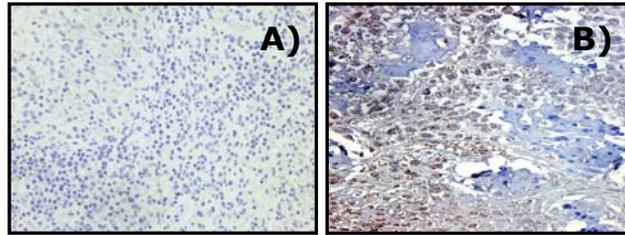


Figura 29. Análisis de la expresión de osteocalcina por las células tumorales de osteosarcoma canino. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de osteocalcina en tumores de osteosarcoma canino parafinados. La expresión de osteocalcina queda representada con el marcaje de coloración marrón. Los núcleos de las células se tiñeron con hematoxilina (coloración azul-lila). **(A)** Muestras de un tumor de hemangiosarcoma canino. **(B)** Muestras de un tumor de osteosarcoma canino. Las fotografías presentan una amplificación por 40X.

3.2.2 Toxicidad relacionada al tratamiento

3.2.2.1 Eventos clínicos adversos

Durante la administración de la terapia y a los 10m, 15m, 30m, 45m, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h y 6h posteriores a la inyección (p.i.) sistémica, el paciente fue evaluado clínicamente. La administración sistémica de la terapia fue bien tolerada y no se detectaron signos agudos de anafilaxis después de la inyección. La temperatura y la frecuencia respiratoria (FR) y cardíaca (FC) excedieron los límites de normalidad a las 2h p.i., tiempo después los valores empezaron a descender (Fig. 30). Durante los 4 días p.i. el paciente presentó un estado febril que fluctuó entre 38.2°C y 39.5°C, sin otros signos/síntomas asociados.

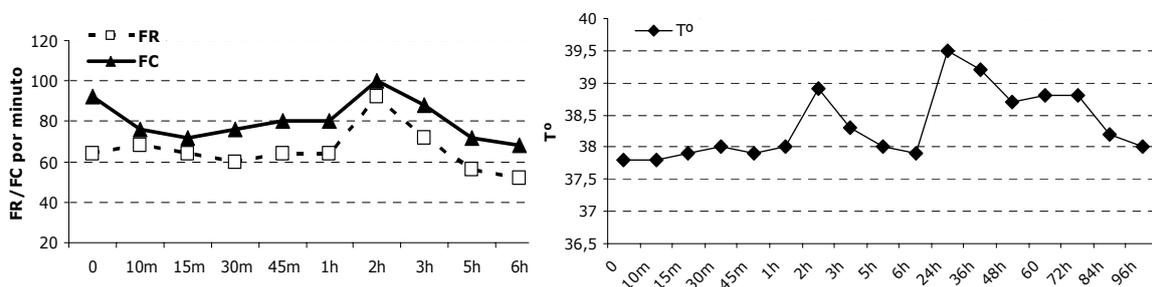


Figura 30. Perfil de los parámetros fisiológicos obtenidos tras la administración sistémica del sistema celular infectado con OCCAV. La valoración de la frecuencia cardíaca (FC) y respiratoria (FR), junto con la T°C corporal, fueron determinadas a diferentes tiempos post-administración por vía sistémica de células tumorales caninas infectadas con OCCAV (3.0×10^8 células).

3.2.2.2 *Datos de laboratorio*

Una vez administrado el tratamiento, se obtuvieron muestras de sangre a 1h, 72h y 10d post-inyección para la evaluación del hemograma. Cambios hematológicos asintomáticos en el hemograma se observaron tras administración de la terapia. El hematocrito mostró una disminución al tercer día post-inyección. No se observaron cambios ni en el recuento plaquetario ni en el leucograma. En la figura 31 se muestran los resultados del hemograma obtenidos a tiempo basal, a los 3d y 10d post-inyección.

En el análisis de la bioquímica sanguínea no se observaron cambios en los valores de la bilirrubina total, ALT, GGT, proteínas totales, creatinina, urea, calcio, potasio y fósforo en las muestras obtenidas a día 3, 10, 17, 35 y 60. En la tabla 10 se describen los resultados en la analítica bioquímica sérica a tiempo basal y a día 3, 10, 17, 35 y 60 post-inyección (Tabla 13).

Tabla 13. Perfil bioquímico sanguíneo posterior a la administración sistémica de células tumorales caninas infectadas con OCCAV

Parámetros Bioquímicos	Basal	3d	10d	17d	35d	60d	Valores de Referencia
Bilirrubina Total, mg/dl	0,2	0,23	0,2	0,21	0,21	0,2	(0,1-0,5)
ALT, UI/L	1	1	1	2	2	3	(21-102)
GGT, UI/L	68	36	36	37	45	53	(1,2-6,4)
Fosfatasa Alcalina, UI/L	194,56	146,47	125,42	166,38	218,77	214,7	(20-156)
Proteínas Totales, g/dl	6,98	5,22	5,08	5,28	6,63	6,31	(5,4-7,1)
Creatinina, mg/dl	0,97	0,76	0,75	0,69	0,89	0,78	(0,5-1,5)
Urea, mg/dl	18,5	14,6	14,2	10,6	16,1	18,8	(21,4-59,9)
Calcio, mg/dl	10,4	9,3	9,1	9,4	9,7	9,9	(9-11,3)
Potasio, mmol/L	4,03	4,16	4,2	3,92	3,6	3,46	(4,37-5,35)
Fósforo, mg/dl	2,83	4,63	4,61	3,94	3,68	3,8	(2,6-6,2)

* El perfil bioquímico fue analizado en el Servicio de Bioquímica Clínica Veterinaria, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona.

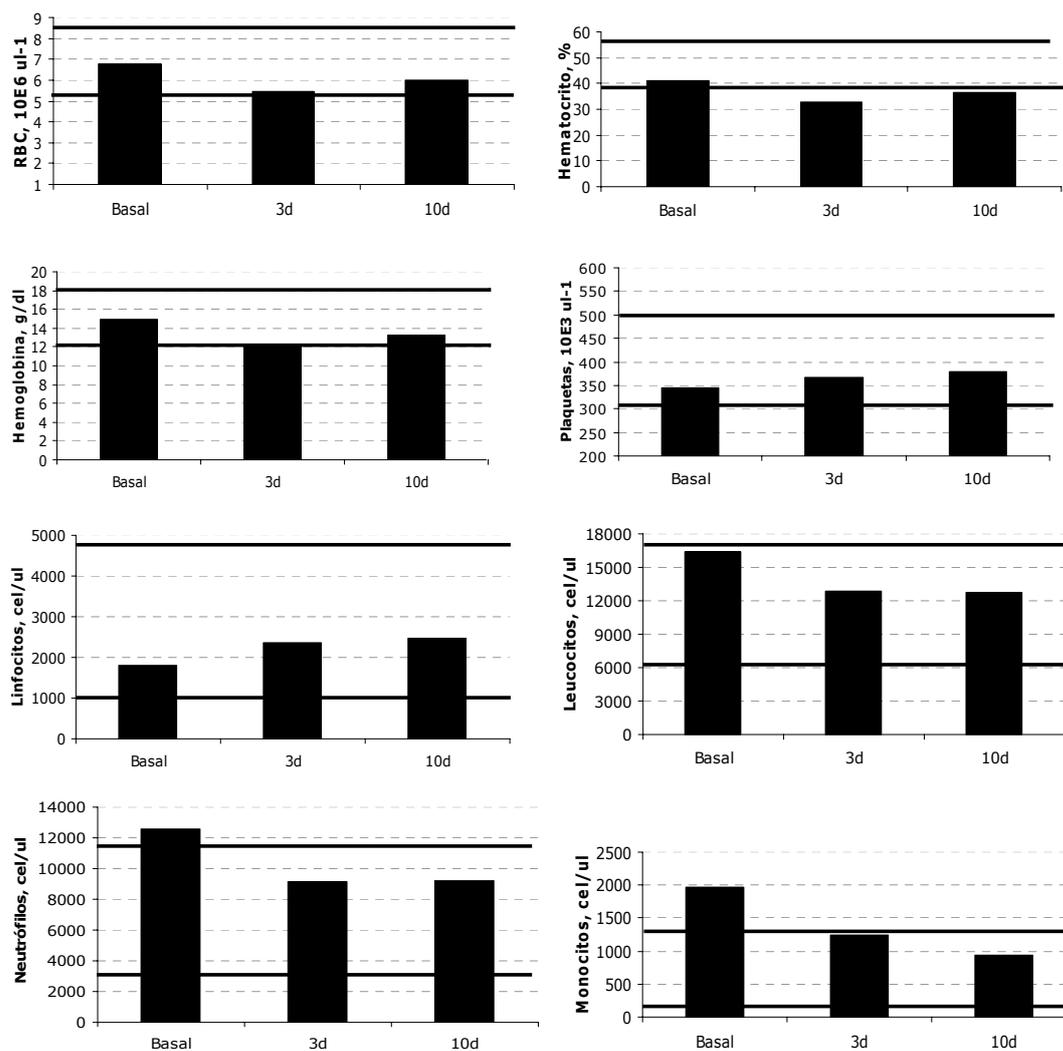


Figura 31. Perfil hematológico obtenido tras la administración sistémica del sistema celular infectado con OCCAV. Después de la administración sistémica de las células tumorales caninas infectadas con OCCAV (3×10^8 cel/perro) se obtuvieron muestras de sangre para su análisis hematológico a 1h, 3d y 10 días posteriores a la administración de la terapia. El hemograma fue analizado en el Servicio de Hematología Clínica Veterinaria, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona. Valores de referencia hematológicos (representación de intervalos entre líneas negras): Recuento eritrocitos (RBC): 5.5-8.5 ($\times 10^6 \mu\text{l}^{-1}$); Hematocrito: 37-55 (%); Hemoglobina: 12-18 (g/dl); Plaquetas: 300-500 ($\times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$); Leucocitos: 6000-17000 (cel/ μl); Linfocitos: 1000-4800 (cel/ μl); Neutrófilos: 3000-11500 (cel/ μl); Monocitos: 150-1350 (cel/ μl).

3.2.3 Determinación de los anticuerpos neutralizantes

El paciente presentó antes del inicio de la terapia niveles de anticuerpos neutralizantes séricos de 1:640, determinado por la mayor dilución de suero que resulta en al menos el 50% de inhibición de la infección cuando se incubaba con 1×10^6 vp de CAV-GFP. Desde el día 3 y hasta al menos 60 días post-inyección se detectaron títulos de anticuerpos neutralizantes en un alza progresiva y constante. Al final del estudio el paciente presentó un título de 1:10240 (Fig. 32).

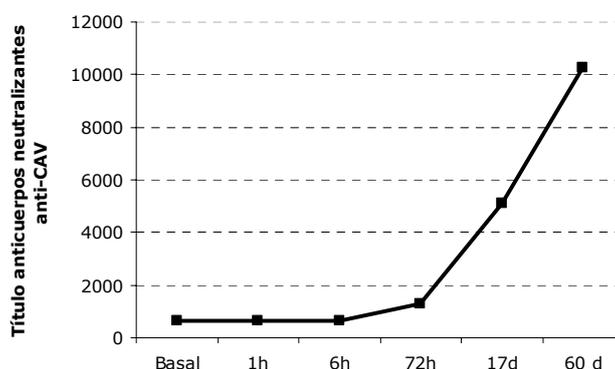


Figura 32. Cinética del título de anticuerpos neutralizantes en un paciente canino inyectado por vía sistémica con células tumorales infectadas con OCCAV. Muestras de suero obtenidas inmediatamente antes y a 1h, 6h, 72h, 17d y 60d tras la administración de las células tumorales caninas infectadas con OCCAV (3×10^8 cel/perro) fueron cuantificadas para la detección del título de anticuerpos neutralizantes presentes. La determinación se realizó por la mayor dilución de suero que resultó en al menos el 50% de inhibición de la infección cuando se incubaron con 1×10^6 vp de CAV-GFP. Los valores representan la media de triplicados.

3.2.4 OCCAV en orina, saliva y sangre

La determinación de las partículas virales infectivas en las muestras biológicas secretadas/excretadas nos permitió valorar el riesgo potencial de transmisión del virus. Muestras de orina y saliva se obtuvieron del paciente a tiempo basal, a 1h, 6h, 72h y 10 días tras la administración del tratamiento. Todas las muestras de orina y saliva analizadas en busca de evidencias de eliminación viral vía inmunotinción del hexón del adenovirus resultaron negativas en todos los tiempos analizados.

La determinación absoluta del número de genomas virales en sangre fue cuantificada por PCR a tiempo real, utilizando una sonda taqman y cebadores para detectar la región E1A de OCCAV. Como se muestra en la figura 33, la cantidad de genomas virales de OCCAV presentes en sangre se detectaron por al menos 10 días. El pico de viremia se detectó a partir de 1h y hasta 6h post-administración intravenosa. Desde el día 3 y hasta al menos el día 10 post-inyección la cantidad de genomas detectados fueron disminuyendo progresivamente.

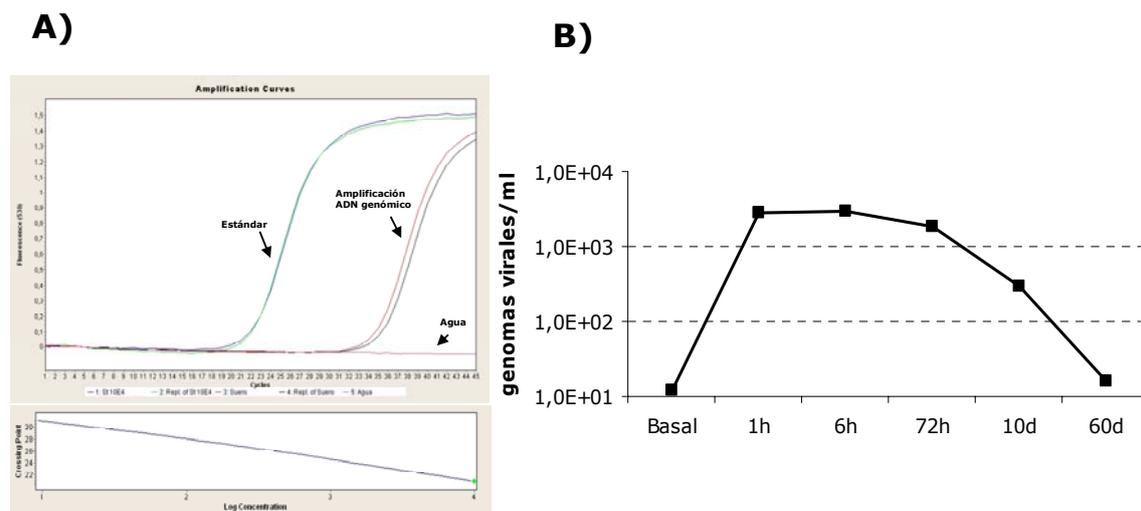


Fig. 33. Cinética de cuantificación viral en sangre tras la administración sistémica del sistema celular infectado con OCCAV. Células tumorales caninas infectadas con OCCAV (3.0×10^8 cel/perro) fueron administradas sistémicamente. Muestras de sangre fueron obtenidas inmediatamente antes y a la 1h, 6h, 72h, 10d y 60 días p.i. La extracción del ADN genómico se obtuvo por el kit Genomic DNA NucleoSpin Blood (Macherey-Nagel) y, posteriormente, la determinación absoluta del número de genomas virales en sangre fue cuantificada por PCR a tiempo real, utilizando una sonda taqman y cebadores para detectar la región E1A de OCCAV. **(A)** Curvas de amplificación correspondiente a la muestra de suero a día 10. **(B)** Gráfica de la cinética de cuantificación viral en sangre posterior a la administración sistémica de células infectadas con OCCAV. Los resultados representan la media de duplicados.

El perro fue sacrificado a los 6 meses tras la administración de la terapia por la progresión misma de la enfermedad. No se pudo realizar la necropsia y, subsecuentemente, no se obtuvieron muestras para la cuantificación absoluta de genomas virales presentes en tejidos/órganos ni para análisis de replicación viral.

VII. DISCUSIÓN

1. CÉLULAS DE OSTEOSARCOMA CANINO TRANSPORTADORAS DE VIRUS ONCOLÍTICO COMO ESTRATEGIA PARA EVADIR LOS ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES.

En los últimos años la incidencia de cáncer en la población canina ha aumentado. El cáncer es una enfermedad relacionada con la edad y la mayor expectativa de vida que tienen actualmente las mascotas ha resultado en un aumento de esta patología. El desarrollo de la enfermedad neoplásica en los perros ocurre espontáneamente y en un contexto inmune intacto, donde el tumor y el microambiente huésped-tumor son singénicos. El inicio y progresión de la enfermedad tumoral están influenciados por factores similares tanto en el hombre como en el perro, incluyendo la edad, la nutrición, el sexo, el estado reproductivo y la exposición ambiental (Paoloni and Khanna, 2008). El osteosarcoma es el tumor óseo primario más frecuente en perros, representando cerca del 85% de todas las patologías óseas (Withrow et al., 1991). A pesar de que en las últimas décadas se ha avanzado significativamente en el tratamiento del osteosarcoma canino, la combinación de quimioterapia y cirugía continúa teniendo un mal pronóstico. Consecuentemente, es necesario el desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento del osteosarcoma. La utilización de un adenovirus de replicación selectiva abre nuevas opciones de tratamiento. El OCCAV es un adenovirus derivado de CAV2 que contiene el promotor de osteocalcina para restringir la replicación viral a células caninas de osteosarcoma y que muestra un buen perfil de eficacia combinado con gran selectividad. Sin embargo, muchos pacientes caninos presentan niveles de anticuerpos preexistentes anti-CAV2 como consecuencia de infecciones previas o bien por programas de vacunación (Gahery-Segard et al., 1998). Estudios previos con vectores adenovirales humanos han demostrado que los anticuerpos neutralizantes antivirales representan el mayor obstáculo en el transporte sistémico de adenovirus oncolítico que impide el efecto oncolítico en la célula diana (Alemany et al., 2000). Estos datos sugieren que un sistema de transporte capaz de ocultar el virus en la circulación sanguínea puede ser una buena estrategia para lograr el transporte sistémico de virus oncolíticos al tejido diana en presencia de la inmunidad adaptativa.

En esta tesis se describe el uso de células caninas de osteosarcoma como vehículos de transporte de un adenovirus oncolítico derivado de CAV2. Se demuestra que células de osteosarcoma irradiadas post-infección retienen su actividad antitumoral en presencia de anticuerpos neutralizantes, incluso por vía sistémica, aumentando la eficacia antitumoral del virus desnudo. Aunque los

resultados obtenidos provienen de un modelo murino inmunodeficiente, proveen una importante prueba de concepto que puede ser la base de futuros estudios en modelos caninos. La evaluación de estrategias antitumorales en perros con tumores espontáneos tiene un interés que va más allá del campo de la medicina veterinaria, ya que también es un modelo relevante para la investigación de la medicina humana.

Paralelamente, la administración intratumoral y sistémica de este sistema celular en dos perros con osteosarcoma espontáneo aportó datos preliminares de seguridad de administración, toxicidad y eliminación.

La radiación ionizante de las células tumorales de osteosarcoma D17 y Abrams no afecta la cinética de producción de OCCAV.

La principal ventaja de la utilización de células tumorales como transportadoras de virus es la amplificación de la dosis inicial de virus inoculada *in vitro* (Willmon et al., 2009). Por razones de seguridad clínica, la administración en pacientes de células tumorales como vehículos de transporte para los vectores adenovirales requiere de una medida de seguridad en contra del riesgo oncogénico residual a las pocas células que pudiesen escapar de la infección viral. La radiación ionizante post-infección es el tratamiento de elección, ya que preserva la replicación viral sin afectar la cinética de producción y liberación de la progenie viral, al tiempo que suprime el crecimiento de las células tumorales transportadoras (Coukos et al., 1999; Guo et al., 2008; Raykov et al., 2004). En este trabajo, las células tumorales de osteosarcoma D17 y Abrams fueron 'esterilizadas' con una dosis letal de radiación ionizante (30 Gy) post-infección. Los resultados de la cinética de producción de OCCAV en células irradiadas post-infección muestran que la replicación del virus OCCAV no se ve afectada significativamente en comparación con células no irradiadas. Resultados similares fueron observados por Power et al. (2008) y Coukos et al. (1999), donde células irradiadas post-infección con Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV) y Virus Herpes Simplex (HSV), respectivamente, no variaron significativamente la producción viral respecto a células no irradiadas.

Un punto de control importante en el sistema de transporte celular corresponde al tiempo de infección in vitro de las células transportadoras.

Si el virus puede replicarse en el vehículo celular, se transporta más virus al tumor del que fue cargado *in vitro*. Por esta razón, la compatibilidad entre la

cinética del transporte y la replicación viral es importante. Si esta compatibilidad no existe, la carga viral puede liberarse antes de llegar al tumor y activar los mecanismos de defensas anti-virales (Willmon et al., 2009). Por lo tanto, la fase de infección *in vitro* es un punto crítico de control en el sistema de transporte mediado por células. Para lograr una evasión inmune efectiva se necesitan tiempos de infección cortos, evitando la expresión de antígenos virales en la superficie de la membrana celular que puedan inducir una neutralización de las células por los anticuerpos anti-virales (Power and Bell, 2008), aunque los anticuerpos neutralizantes reconocen a proteínas virales que en el caso de los adenovirus no se expresan en la superficie de la célula transportadora (Hong et al., 2003). Sin embargo en esta tesis el período de infección *in vitro* fue controlado en 4h, que corresponde al mínimo tiempo necesario para infectar la mayor proporción de células tumorales y en el cual no existe ni producción ni liberación del virus (Fig. 9-10).

El sistema de transporte mediado por células de osteosarcoma canino transporta eficientemente AdTL al tumor en presencia de anticuerpos neutralizantes anti-CAV2.

La eliminación de adenovirus oncolíticos por la inmunidad preexistente o por la respuesta inmune adaptativa generada tras la administración de virus ha limitado la eficacia antitumoral en ensayos clínicos. Se han realizado muchos estudios en el campo de la terapia génica utilizando vectores adenovirales de replicación defectiva para determinar el efecto de la inmunidad preexistente. Los resultados han demostrado el efecto negativo que tiene la respuesta inmune preexistente sobre la transferencia y expresión de genes en el tejido diana (Schulick et al., 1997; Vlachaki et al., 2002). Recientemente, un estudio realizado por Zaiss et al. (2009) revela que los anticuerpos antivirales tienen funciones que van más allá de la neutralización del virus ya que modulan la interacción del adenovirus con las células inmunes innatas. En este estudio, la presencia de anticuerpos neutralizantes aumentó significativamente la internalización viral en los macrófagos y en directa correlación con el aumento de la internalización viral los anticuerpos amplificaron la respuesta inmune innata contra el adenovirus, sugiriendo una regulación positiva del sistema inmune adaptativo sobre el sistema inmune innato y el estado antiviral. La presencia de altos títulos de anticuerpos anti-CAV2 en perro requiere de una aproximación terapéutica diferente a la administración del virus desnudo. El transporte sistémico efectivo del virus cargado en células tumorales en presencia de anticuerpos anti-virales fue demostrado en un estudio de biodistribución como

prueba de concepto. Los resultados obtenidos indican que en un modelo murino de osteosarcoma canino inmunizado los anticuerpos neutralizantes bloquean al virus desnudo antes de llegar al tumor, reduciendo significativamente la dosis terapéutica administrada. Por el contrario, las células transportadoras tumorales D17 y Abrams llegan al tumor independientemente del título de anticuerpos neutralizantes. Cabe destacar que aunque el nivel de expresión de luciferasa en tumores fue siempre mayor en el grupo AdTL desnudo respecto al grupo D17 y Abrams, la comparación directa entre los grupos es incorrecta porque la cantidad de virus inicialmente inoculada es diferente. La cantidad de virus dentro de las células transportadoras es menor que la del inóculo de virus desnudo. El análisis de las ratios de las diferentes aproximaciones terapéuticas (AdTL desnudo, D17-AdTL y Abrams-AdTL) ofrece una comparación válida de la cantidad de virus detectado en tejidos en presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes y del beneficio terapéutico otorgado por cada aproximación. De esta manera, los resultados del estudio de biodistribución determinaron que el beneficio otorgado por la administración del virus desnudo en ratones inmunizados es sólo de 2.36 y 1.53 veces mayor respecto a las células D17 y Abrams, respectivamente (Tabla 10). Si se considera que AdTL es un virus no replicativo, la cantidad de partículas virales que pueden ser inoculadas utilizando un virus replicativo sería mayor por la amplificación del virus dentro de la célula tumoral. Consecuentemente, utilizando un adenovirus replicativo se esperarían mayores niveles de transducción en el tejido tumoral. Por lo tanto, los resultados aquí obtenidos sugieren que la llegada de la célula transportadora al tejido diana no se ve afectada por los anticuerpos neutralizantes y que la amplificación de la dosis inicialmente inoculada *in vitro* si se utilizara un adenovirus replicativo otorgaría una clara ventaja respecto a la administración de un adenovirus desnudo. Estos resultados son consistentes con los publicados por Power et al. (2007) y Hamada et al. (2007). Administrando sistémicamente células murinas CT26 de carcinoma de colon infectadas con el virus de la Estomatitis Vesicular (VSV), Power et al. demostraron la infección del tejido pulmonar diana en presencia de altos títulos de anticuerpos anti-VSV. Asimismo, Hamada et al. (2007) observaron además una respuesta antitumoral cargando el adenovirus AxCAmGM-CSF en células humanas de carcinoma de pulmón A549 y células embrionarias de riñón HEK293 en un modelo murino de carcinoma ovárico inmunizado OVHM. Sin embargo, Ong et al. (2007) publicaron que el transporte viral mediado por células era dependiente del título de anticuerpos neutralizantes, es decir, en presencia de altos títulos de anticuerpos neutralizantes no se observó infección del tejido diana. Es importante destacar que en el trabajo realizado por Ong et al. (2007) no se consideró la cinética de expresión de antígenos virales en la superficie de las células

transportadoras, por lo que la falta de infección del tejido tumoral diana en presencia de altos títulos de anticuerpos neutralizantes pudo ser el resultado de neutralizaciones de las células transportadoras en la circulación sanguínea.

Para llegar a los focos tumorales diseminados que no son accesibles por inyección directa, los vectores virales terapéuticos deben ser administrados por vía sistémica. El principal problema de la administración sistémica de adenovirus oncolíticos es el secuestro de las partículas adenovirales en el hígado, que reduce la cantidad de vector que puede llegar al tumor y que genera además toxicidad hepática. La toxicidad hepática se debe por un lado a la entrada de las partículas físicas y a la expresión de un transgen y, por otro lado, a la activación de la respuesta inmune tras la fagocitosis por las células de K upffer (Mathis et al., 2005). Estudios previos han determinado que la dosis terapéutica de adenovirus oncolíticos a menudo se ve limitada por la toxicidad hepática posterior a la administración por vía endovenosa (Power and Bell, 2008). En esta tesis, la ausencia de transducción hepática de adenovirus oncolítico cargado en células transportadoras D17 y Abrams sugiere una prevención de la toxicidad hepática limitante tras la administración sistémica. Otros estudios utilizando también células transportadoras no hematopoyéticas determinaron que la retención de las células transportadoras en los capilares pulmonares se correlacionaba con la ausencia de toxicidad hepática (Power and Bell, 2007; Power and Bell, 2008; Power et al., 2007). Sin embargo los resultados obtenidos en este trabajo muestran bajos niveles de expresión de luciferasa en el parénquima pulmonar tras la administración sistémica del sistema celular de transporte, sugiriendo que las células transportadoras además de proteger al virus de la neutralización por los anticuerpos pueden eludir al hígado evitando la toxicidad hepática limitante en la administración por vía sistémica.

Células transportadoras heterólogas median el transporte sistémico de OCCAV en un modelo murino inmunizado de osteosarcoma canino.

Estudios previos de terapias basadas en células transportadoras describen la necesidad de utilizar células autólogas como vehículos de transporte sistémico, debido a la histoincompatibilidad de las células heterólogas (alogénicas y xenogénicas) que las hacen susceptibles de un rechazo inmunológico (Harrington et al., 2002). Sin embargo en el trabajo realizado por Power et al. (2007) en un modelo murino inmunocompetente de cáncer pulmonar se determinó que el transporte sistémico mediado por células tumorales del Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV) se puede alcanzar utilizando tanto células alogénicas como

xenogénicas. Sumado a lo anterior, en el año 2008 el trabajo realizado por Power y Bell describe una cinética de eliminación diferente entre las células tumorales transportadoras alogénicas y xenogénicas. Utilizando el mismo modelo murino inmunocompetente de cáncer de pulmón, las células alogénicas transportadoras de VSV permanecieron en el tejido pulmonar diana entre 24-48h, mientras que las células xenogénicas se eliminaron dentro de las primeras 8h post-administración. Estos hallazgos son consistentes con los mecanismos de rechazo inmunológico, en el cual la activación de la respuesta adaptativa mediada por las células T es la responsable del rechazo alogénico, mientras que la diana xenogénica es rápidamente eliminada por los factores del sistema inmune innato como lo son los anticuerpos preformados y las proteínas del complemento (Zaiss et al., 2009a).

En esta tesis si bien no se compararon las diferencias en el transporte de AdTL u OCCAV entre células tumorales alogénicas o xenogénicas en un mismo modelo de osteosarcoma canino, la administración de las células D17 y Abrams en el modelo murino correspondió a una administración de células xenogénicas, mientras que la administración de las células D17 y Abrams en dos perros correspondió a una administración de células alogénicas. Tanto si las células transportadoras fueron alogénicas o xenogénicas, los resultados mostraron que el sistema celular transportador de virus es capaz de infectar a la célula tumoral. Así, en el contexto del modelo murino de osteosarcoma canino, se demuestra que la administración de AdTL u OCCAV cargado en células xenogénicas puede infectar al parénquima tumoral validado por los niveles de expresión de luciferasa (Fig. 15) o por la tinción inmunohistoquímica del hexón de adenovirus canino (Fig. 21), respectivamente. En el contexto del perro la detección inmunohistoquímica de la replicación viral en la administración intratumoral (Fig. 28) de células autólogas certifican la correcta infección de la célula tumoral diana. Sin embargo, es importante estudiar cuando las células transportadoras alogénicas o xenogénicas inducen una respuesta inmune adaptativa que puede inhibir el transporte del virus oncolítico en administraciones repetidas de esta terapia antitumoral mediada por células.

2. SISTEMA CELULAR DE TRANSPORTE DE OCCAV COMO ESTRATEGIA TERAPÉUTICA ANTITUMORAL DEL OSTEOSARCOMA CANINO

La aproximación terapéutica mediada por células ofrece la capacidad de evasión de la inmunidad preexistente, la distribución del virus por el cuerpo y el transporte al tejido diana. Por otro lado OCCAV ofrece, si es correctamente transportado, su capacidad lítica de la célula diana. Como prueba de concepto la administración terapéutica del sistema celular infectado con OCCAV fue probado en ratones inmunodeficientes mediante administración intratumoral y sistémica.

El sistema celular transportador de OCCAV presenta una respuesta terapéutica antitumoral en un modelo xenoinjertado de osteosarcoma canino.

La administración intratumoral única de las células D17 y Abrams infectadas con OCCAV no mostró ninguna actividad antitumoral. Sin embargo, administraciones repetidas de células infectadas con OCCAV resultaron en un menor crecimiento del tamaño tumoral comparado con OCCAV desnudo. El mecanismo por el cual se observa una mayor eficacia antitumoral del sistema celular transportador respecto al virus desnudo es desconocido. Una hipótesis puede ser una mejor biodistribución viral dentro del tumor en ratones tratados con el sistema celular. Otra hipótesis puede ser que administraciones repetidas de células transportadoras por vía intratumoral en ratones Balb/c *nu/nu* (que tienen respuesta inmune innata) estimulen una substancial respuesta innata a través de la llegada de macrófagos y células *Nk* (del inglés *natural killer cells-NK*) al tumor que cause la observada reducción del crecimiento tumoral. Globalmente no existen diferencias significativas en la actividad terapéutica antitumoral entre ambas líneas celulares transportadoras aunque la regresión completa de 3 tumores ($n=10$) en el grupo de ratones inyectados con D17 sugiere una mayor actividad oncolítica en ésta línea celular. Los resultados aquí obtenidos son consistentes con los publicados por Hamada et al. (2007). En dos modelos de cáncer de ovario, la administración intratumoral durante 6 días consecutivos de células A549 (adenocarcinoma de pulmón humano) y HEK293 (embrionarias de riñón humano) cargadas con un adenovirus de replicación selectiva (AdE3-IAI.3B) mostró un 100% de regresiones completas tras la administración de la terapia, mientras que la administración del virus AdE3-IAI.3B desnudo no presentó ninguna eficacia antitumoral. Los resultados de Hamada et al. (2007) sugieren que talvez más inyecciones por vía

intratumoral del sistema celular propuesto en este trabajo puedan inducir un mayor beneficio antitumoral. Respecto a la administración intratumoral de OCCAV desnudo, los resultados presentados por Hemminki et al. (2003) muestran que la administración intratumoral única de OCCAV a una dosis de 1×10^8 vp/tumor presenta una actividad antitumoral significativa respecto al PBS, pero que sorprendentemente una dosis de 1×10^9 vp/tumor no la presenta. En esta tesis la administración intratumoral durante 3 días consecutivos de OCCAV a una dosis de 1×10^{10} vp/tumor no demostró tener ningún efecto antitumoral. Por otro lado un factor determinante en la respuesta antitumoral es la línea celular utilizada para la tumorogénesis. En este trabajo, el efecto terapéutico de OCCAV en otros modelos tumorales de osteosarcoma canino no pudo ser evaluado por la falta de células tumorogénicas disponibles. Como describe Hemminki et al. (2003) la línea tumoral D17 no es tumorogénica en ratones inmunodeficientes.

La inyección sistémica de adenovirus oncolíticos es deseable en un protocolo de administración en viroterapia porque aborda a la enfermedad metastásica. La capacidad de las células tumorales transportadoras de infectar a células metastásicas se ha demostrado en estudios previos (Coukos et al., 1999; García-Castro et al., 2005). La localización de las células tumorales transportadoras en sitios de metástasis no puede ser explicada solamente por factores anatómicos (vía de inyección y efecto de primer paso anatómico) aunque el mecanismo exacto de la atracción de la célula transportadora tumoral al tumor no se conoce. García-Castro et al. (2005) describen tres posibles mecanismos. Primero, las células tumorales pueden hacer diana al tumor bajo los mismos mecanismos que determinan la llegada de las células metastásicas a los órganos como lo es la atracción por quimioquinas (Muller et al., 2001). Segundo, las células tumorales transportadoras inyectadas sistémicamente pueden unirse al endotelio vascular similar a como lo hacen las micrometástasis intravasculares (Al-Mehdi et al., 2000). Tercero, las células tumorales pueden interactuar con factores del tejido diana que gobiernan la extravasación de las metástasis (Cameron et al., 2000; Liotta and Kohn, 2001). Consistentemente con lo anterior, experimentos *in vitro* han demostrado que células tumorales no invasivas pueden migrar a través de una matriz tridimensional siguiendo el rastro de células tumorales invasivas, lo cual sugiere que la migración e invasión puede ser modulada por señales generadas por otras células tumorales (Horino et al., 2001). Además, se ha demostrado que tumores infiltrativos del sistema nervioso central pueden mandar señales que son leídas y seguidas por células neurales específicas (Aboody et al., 2000), lo que enfatiza el

rol de las señales propias del tumor para reclutar otras células dentro del microambiente metastático.

En este trabajo, la respuesta antitumoral tras la administración sistémica del sistema celular infectado con OCCAV fue diferente a lo observado por vía intratumoral. Los resultados muestran que por administración sistémica las células D17 tienen una mayor actividad oncolítica comparada con las células Abrams y PBS, las células Abrams no demuestran tener ningún control en el crecimiento de los tumores y la mezcla celular homogénea D17/Abrams muestra una mayor actividad antitumoral respecto al PBS. Estos datos sugieren que el tipo de célula tumoral que se utiliza como vehículo de transporte de virus oncolítico parece tener un importante rol en determinar el resultado de la terapia antitumoral. Si bien los resultados de biodistribución muestran que las células tumorales D17 y Abrams son igualmente capaces de transportar a OCCAV al tejido diana en presencia de anticuerpos neutralizantes (Fig. 15), la actividad antitumoral de ambas líneas celulares es diferente en el modelo *in vivo* estudiado. Probablemente sea la mayor producción viral de las células D17 el determinante de la mayor eficacia antitumoral. Los resultados de la cinética de producción de OCCAV muestran que las células D17 producen 31 veces más virus que las células Abrams, lo que ofrece un aumento potencial en la amplificación de la dosis inicialmente inoculada. Una confirmación adicional de la hipótesis de que la producción viral de las células transportadoras está correlacionada con la actividad antitumoral proviene de la observación de que la mezcla homogénea de células D17/Abrams muestra una eficacia terapéutica intermedia entre las células D17 y las células Abrams como poblaciones celulares únicas. Los resultados publicados por Hamada et al. (2007) coinciden en la observación que son las células tumorales con mayor producción viral las que *in vivo* muestran un mayor control del crecimiento del tumor, aunque al contrario de los resultados de esta tesis, determinan también que una mezcla homogénea de células tumorales transportadoras de adenovirus muestra una mayor actividad antitumoral que la administración de poblaciones celulares únicas. Por otro lado, la mayor actividad antitumoral de las células D17 probablemente se deba a una biodistribución intratumoral más homogénea respecto a los otros sistemas celulares administrados. El análisis inmunohistoquímico de los tumores tratados con células D17 infectadas con OCCAV revela una mayor área de necrosis comparado con los tumores inyectados con los otros dos tratamientos. En conjunto estos resultados permiten determinar que es la línea tumoral D17 la línea de elección en una estrategia terapéutica para el tratamiento del osteosarcoma canino.

Las células D17 infectadas con OCCAV tienen una respuesta terapéutica antitumoral en presencia de anticuerpos neutralizantes anti-CAV2.

En esta tesis el modelo animal utilizado para evaluar la eficacia antitumoral de adenovirus oncolíticos canino corresponde a ratones Balb/c *nu/nu*. Estos tienen una pérdida del linaje de células T y por lo tanto una incapacidad de maduración de una respuesta inmune. Sin embargo son capaces de generar inmunoglobulinas M (IgM) que son útiles para valorar el impacto que tienen los anticuerpos neutralizantes tanto en el transporte viral como en la respuesta antitumoral. En esta tesis la generación de anticuerpos neutralizantes se realizó a través de una inmunización activa, obteniéndose títulos de anticuerpos relativamente bajos pero suficientes para evaluar la correcta protección del virus dentro de la célula transportadora, al menos como prueba de concepto, tal y como queda demostrado en el estudio de biodistribución. Sería interesante verificar la protección que confieren las células transportadoras frente a mayores títulos de anticuerpos neutralizantes que pueden ser generados, por ejemplo, a través de una inmunización pasiva mediante administración intraperitoneal de suero de ratones inmunocompetentes previamente inmunizados.

Desde un punto de vista clínico es relevante que la efectividad antitumoral de las células D17 infectadas con OCCAV se mantenga incluso en presencia de anticuerpos neutralizantes. Este resultado indica que la presencia de anticuerpos neutralizantes no elimina la habilidad de las células tumorales de transportar el virus oncolítico y consecuentemente de controlar el crecimiento tumoral.

A pesar del rol detrimental que tiene la inmunidad humoral en el transporte de virus oncolíticos, se ha postulado también que la inmunogenicidad de las mismas células transportadoras pueden aumentar la respuesta antitumoral, así como la activación de la inmunidad antitumoral durante la viroterapia puede contribuir en algún grado a eliminar el tumor. Aunque en estudios previos utilizando células tumorales transportadoras de virus oncolíticos no se ha demostrado actividad antitumoral de células no infectadas irradiadas administradas por vía intratumoral o sistémica (Coukos et al., 1999; Hamada et al., 2007), la inmunogenicidad de las células transportadoras potencialmente pueden aumentar la respuesta anti-neoplásica. El patrón de proteínas antigénicas de las células tumorales transportadoras es muy similar al del tumor *per se*, por tanto los antígenos tumorales liberados tras la destrucción de las células transportadoras y de las células del tumor pueden ser captados por las células presentadoras de

antígenos (del inglés *antigen presenting cells-APCs*) y presentados a las células T, con la consecuente respuesta inmunológica específica al tumor (Zaiss et al., 2009a; Zaiss et al., 2009b). Por otro lado, también se ha sugerido que el Virus Herpes Simplex (HSV) (Guo et al., 2008) y el Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV) (Power et al., 2007) parecen activar una respuesta antitumoral inmunomediada independientemente de la oncólisis que inducen. Por lo tanto, la destrucción del tumor por virus oncolíticos, ya sean administrados solos o cargados en células transportadoras, se puede alcanzar por múltiples mecanismos. El efecto de la respuesta inmune antitumoral inducida por el tratamiento con las células D17 infectadas con OCCAV no ha sido evaluado por la falta de modelos preclínicos adecuados. Si bien recientemente se ha desarrollado un nuevo modelo semipermissivo a la replicación del adenovirus para el estudio de los vectores oncolíticos basados en el hAd5 (Thomas et al., 2006), el Hámster de Siria, este modelo no ha sido probado para la replicación del adenovirus canino. En el trabajo presentado por Hamada et al. (2007) se demuestra que en el sistema de células transportadoras la transfección viral hacia la célula tumoral diana ocurre mediante fragmentos celulares derivados de las mismas células transportadoras que contienen a las partículas virales que son engullidos por las células diana, mecanismo que además no es inhibido por los anticuerpos anti-adenovirus. Además en este sistema, la infección adenoviral del tejido tumoral diana mediado por las células tumorales transportadoras producen una respuesta de los linfocitos T citotóxicos (CTL) tanto hacia la célula diana como hacia el adenovirus.

La inmunosupresión con ciclofosfamida otorga un beneficio a la administración sistémica de OCCAV desnudo, pero no favorece la actividad antitumoral demostrada por las células D17 infectadas con OCCAV.

La ciclofosfamida (CPA) es un agente alquilante de la familia de las oxasoforinas que posee potentes propiedades inmunosupresoras y citotóxicas. La ciclofosfamida tiene un amplio rango de efectos, dentro de los cuales están el aumentar la replicación viral mediante la reducción de los anticuerpos neutralizantes (Ikeda et al., 1999; Qiao et al., 2008a), la disminución de las células T regulatorias (Treg cells) (DiPaolo et al., 2006), la reducción de la permeabilidad de la vasculatura tumoral (Kurozumi et al., 2007) y de la menor infiltración de las células inmunes innatas (Fulci et al., 2006). Estudios previos han demostrado que la inmunomodulación con ciclofosfamida aumenta la eficacia antitumoral en viroterapia (Prestwich et al., 2009). En un modelo de glioma en ratas, el pre-tratamiento con ciclofosfamida inhibió la infiltración asociada a tumor de células

fagocíticas tras la administración del Virus Herpes Simplex (HSV), promoviendo una mayor replicación del virus y un aumento en la supervivencia (Fulci et al., 2006); también en el mismo modelo, la ciclofosfamida aumentó la replicación y eficacia antitumoral del Virus Vaccinia (Lun et al., 2009). En un modelo inmunocompetente semi-permisivo a la replicación del hAd5, el pretratamiento con ciclofosfamida inhibió la formación de anticuerpos neutralizantes anti-adenovirus, induciendo una significativa mejora de la supresión del crecimiento tumoral tras la administración de un adenovirus de replicación selectiva (Thomas et al., 2008). A partir de esta evidencia se estudió si la inmunomodulación con ciclofosfamida era capaz de aumentar la potencia oncolítica del sistema celular en un modelo murino inmunizado. Los resultados observados fueron consistentes con los obtenidos previamente: una vez más se observó una mayor capacidad oncolítica de las células D17 infectadas con OCCAV comparado con el OCCAV desnudo tanto en ratones no inmunizados como en los inmunizados y que fueron inmunomodulados con ciclofosfamida. Como ha sido descrito previamente para el adenovirus y para otros virus oncolíticos, la administración de ciclofosfamida en ratones inmunizados otorgó un beneficio terapéutico a la administración de OCCAV desnudo. Los tumores tratados con OCCAV desnudo mas ciclofosfamida presentaron un crecimiento tumoral 45% inferior respecto al PBS, alcanzando por primera vez un volumen tumoral muy similar al observado en los tumores tratados con células D17 infectadas con OCCAV. Sin embargo la potencia oncolítica de las células D17 infectadas con OCCAV no se ve mejorada con la inmunosupresión. A diferencia de lo observado por Dhar et al. (2009), en el modelo murino utilizado en este trabajo la administración de ciclofosfamida parece tener un efecto antitumoral ya que el crecimiento de los tumores fue más lento de lo observado en los experimentos anteriores (a partir del día 10 post-administración) y que los volúmenes tumorales fueron menores incluso en el grupo control PBS. Sin embargo estos datos deben contrastarse con tumores inyectados únicamente con PBS.

3. ADMINISTRACIÓN DE CÉLULAS INFECTADAS CON OCCAV EN PERROS CON OSTEOSARCOMA: ESTUDIO PRELIMINAR.

Los modelos animales preclínicos son utilizados para la evaluación de una prueba de concepto y la valoración de la farmacocinética, farmacodinamia, eliminación viral y seguridad. Idealmente, los modelos singénicos o xenogénicos representan la biología y la patología del tumor de la población clínica diana para así extender la efectividad terapéutica observada en los modelos animales a resultados clínicos. Sin embargo los modelos animales reflejan sólo ciertos aspectos de la biología y la patología del tumor de la población clínica diana. Dentro de los factores limitantes de un modelo xenoinjertado está la incapacidad del adenovirus de replicar en el tejido murino y que la cepa a menudo utilizada es inmunodeficiente, por lo que la valoración de la respuesta inmune es limitada. Otro factor desfavorable en los modelos murinos es la corta vida que tienen por el crecimiento tumoral, lo que impide evaluar la seguridad a largo plazo. La obtención de datos preliminares de eliminación viral y toxicidad en la misma población clínica diana como estrategia para el diseño de un ensayo clínico fase I en perros permite aumentar la seguridad de un correcto diseño fase I.

Cualquier aproximación terapéutica que incluya la administración de células tumorales a pacientes clínicos debe aumentar la seguridad respecto al riesgo oncogénico residual de estas células. Si pocas células escapasen a la infección *in vitro* emergería un potencial riesgo carcinogénico. Por esta razón, en las diferentes aproximaciones terapéuticas utilizadas en este trabajo se utilizan 3 medidas de seguridad. La primera corresponde a la irradiación de las células transportadoras a una dosis que inhibe la proliferación de las células tumorales pero que no afecta la producción de OCCAV. La segunda corresponde a la infección de las células con adenovirus oncolítico a altas m.o.i que causa la lisis de todas las células en cultivo. Y la tercera corresponde al uso de células heterólogas que son eliminadas por el sistema inmune por histoincompatibilidad inmunológica.

Es importante destacar que la obtención de datos del estudio preliminar de toxicidad y eliminación viral en dos perros fueron realizados en paralelo al desarrollo de los estudios preclínicos.

La inmunoviroterapia se podría alcanzar en perros a través de la administración de células heterólogas como vehículos de OCCAV.

En el tratamiento del cáncer con virus oncolíticos el rol que adopta el sistema inmune es clave para direccionar la estrategia terapéutica. Alemany y Cascalló (2009) explican que desde un punto de vista inmunocéntrico, la inmunosupresión inducida por los tumores puede ser desequilibrada por la inmunogenicidad natural de los virus. De ahí que muchos virus se modifican para ser todavía más inmunoestimuladores. Para los inmunocéntricos, la respuesta inflamatoria asociada a patógenos optimiza la presentación de antígenos y ayuda a la exposición de antígenos tumorales ocultos que estimulan a las células inmunes efectoras a destruir a las células tumorales diseminadas que se encuentran fuera del alcance de los virus oncolíticos. Por el contrario, desde un punto de vista virocéntrico el sistema inmune es un obstáculo para la viroterapia. Para los virocentristas la inmunogenicidad del virus tiene un papel detrimental para la respuesta inmune en contra de los antígenos tumorales. Para ellos la inmunosupresión dentro y alrededor del tumor es una ventaja ya que otorga un ambiente privilegiado para la replicación del virus. En esta tesis los estudios realizados en modelos preclínicos tienen una obligada visión virocéntrica ya que el modelo murino atímico utilizado no permite evaluar la función que tiene el sistema inmune en la respuesta antitumoral. Sin embargo en el perro la presencia de un sistema inmunitario competente permite la ejecución de una estrategia inmunocéntrica de la viroterapia: la utilización de una mezcla heteróloga de células como transportadoras de virus podría otorgar un beneficio terapéutico adicional al de la oncólisis inducida por OCCAV, ya que la expresión de más antígenos tumorales asociados a tumor maximizaría la estimulación de una respuesta T sistémica contra sus antígenos tumorales presentados por los antígenos leucocitarios propios (HLA). La efectividad antitumoral y la factibilidad de la administración de células heterólogas en el campo de la inmunoterapia queda demostrada en los trabajos realizados por M.S. Mitchell y D.L. Morton. En 1993, Mitchell et al. publicaron los resultados de un ensayo clínico fase II con la aplicación de una vacuna preparada con lisados de células heterólogas de melanoma en un grupo de 139 pacientes de melanoma metastásico con resultados alentadores. En 1995 este mismo grupo inició un ensayo clínico fase III en pacientes con estadio IV de la enfermedad con la vacuna Melacine™ constituida por lisados de dos líneas celulares alogénicas de melanoma más quimioterapia. También, el grupo dirigido por D.L. Morton publicó en el año 2003 un ensayo clínico fase III donde se observó un aumento significativo del intervalo libre de enfermedad y de la supervivencia en

pacientes con melanoma en estadios III y IV después de la administración de una vacuna (Cancervax™) formada por células completas irradiadas provenientes de tres líneas celulares de melanoma combinadas con BCG (Bacilo de Calmette-Guérin). En medicina veterinaria, también se demostró la factibilidad de la administración y la eficacia antitumoral de una vacuna celular alogénica que expresa un antígeno xenogénico (gp100) en un ensayo clínico fase II en pacientes caninos con melanoma maligno (Alexander et al., 2006).

Ya que en la administración repetida de células heterólogas (alogénicas o xenogénicas) se asume el riesgo potencial de una respuesta inflamatoria sistémica por histoincompatibilidad celular, en el laboratorio se intentó realizar cultivos celulares autólogos provenientes de las biopsias obtenidas de los perros con osteosarcoma. Sin embargo, la utilización de células autólogas para el transporte de virus tiene el inconveniente que la derivación de una línea tumoral establecida es un procedimiento largo que puede tardar 2-3 meses (y no siempre es posible su establecimiento) y consecuentemente durante este tiempo la enfermedad progresa, asumiendo el riesgo que al momento de poder iniciar la terapia la enfermedad esté avanzada lo que dificulta todavía más la eficacia antitumoral del sistema celular. Este inconveniente determinó que el desarrollo del estudio preliminar en perros se realizara con células alogénicas. En la administración intratumoral y sistémica de las células heterólogas no se observó ningún efecto adverso. En referencia a los aspectos de los cultivos celulares es importante comentar que no es posible crecer líneas de osteosarcoma canino en medios sintéticos en ausencia de suero. La única manera de crecer las líneas tumorales fue utilizando un medio complementado con suero fetal bovino. Estas condiciones de cultivo pueden representar un problema para su aplicación en perros por el riesgo de shock anafiláctico por la introducción de proteínas de otra especie animal. Una alternativa sería utilizar medios de cultivos especiales enriquecidos libres de suero como el Ex-Cell™525 (JRH Biosciences)

La administración intratumoral y sistémica del sistema celular transportador es bien tolerada, segura y factible de realizar en perros con osteosarcoma.

Para el foco de este trabajo, toxicidad se define como los efectos adversos ocasionados por el virus sobre la fisiología del perro y eliminación como la presencia del virus en las secreciones/excreciones del perro.

La valoración de la eliminación viral es utilizada para entender el riesgo potencial asociado con la transmisión a terceras partes y el riesgo potencial al medio ambiente (que forma parte de los estudios del ERMA [Environmental Risk Management Authority]). El objetivo de este estudio preliminar es proveer recomendaciones para el diseño de un estudio clínico de toxicidad y eliminación viral en perros inyectados con células tumorales heterólogas infectadas con OCCAV. En particular, en las pruebas de laboratorio clínicas necesarias para evaluar la seguridad de la administración y también en las pruebas de laboratorio utilizados para la detección de OCCAV, en el tipo y frecuencia de muestra biológica que se debe tomar y en la duración del estudio. Debido a la complejidad de la terapia celular transportadora de virus oncolíticos y que la información obtenida de modelos murinos respecto a la seguridad de la dosis de la terapia puede no ser adecuada, la dosis inicial escogida en el estudio preliminar fue baja para obtener un nivel dosis-inicio segura y la estrategia de inyectar primero intratumoral y después sistémicamente fue también por seguridad.

El resultado más importante de la administración intratumoral fue que las células heterólogas infectadas con OCCAV pueden ser administradas con seguridad en perros. La ausencia de toxicidad y la detección de focos de replicación viral en el tumor, sugieren que la estrategia propuesta tiene un potencial terapéutico a seguir desarrollando. Globalmente, la administración intratumoral fue bien tolerada desde un punto de vista clínico tanto en la primera como en la segunda inyección, sin observarse ningún signo o síntoma asociado a toxicidad, por lo que la dosis administrada puede ser aumentada en un futuro a través de un escalado de dosis. La respuesta inflamatoria aguda en la extremidad después de la primera administración de la terapia celular fue de carácter inespecífico, aunque claramente asociada a la inyección de la inmunoviroterapia. Los adenovirus son pro-inflamatorios e inducen tanto una respuesta innata mediada por citoquinas como citotoxicidad mediada por células. La replicación viral dentro del tejido conduce a una infiltración neutrofílica seguida de un influxo de monocitos, macrófagos y eventualmente linfocitos. La detección de genomas virales en el tumor, la inmunodetección de la replicación del virus en el tumor y la ausencia de toxicidad certifican el perfil de selectividad de OCCAV. El estudio de eliminación de virus genómico en muestras de suero fue negativo a todos los tiempos analizados. Si la replicación viral existe, la ausencia de virus en sangre puede deberse al mal diseño de los tiempos de recogida de muestras. Para exactamente valorar el potencial riesgo de transmisión del material eliminado, es importante la determinación de las partículas virales funcionales en las muestras biológicas secretadas/excretas. Por

esta razón, las muestras de orina y saliva post-tratamiento fueron analizadas por inmunodetección del hexón adenoviral. Todas las muestras a todos los tiempos analizados resultaron negativas. La ausencia de detección de material infeccioso en orina y saliva a los 7 días tras la administración y en las sucesivas muestras analizadas certifican el escaso riesgo de transmisión a terceras partes a partir de este tiempo. Sin embargo ajustar los límites de sensibilidad temporal es necesario. Los datos obtenidos en este estudio preliminar nos sugieren que muestras de sangre, saliva y orina deben ser tomados más frecuentemente en los primeros días tras la administración de la terapia viral y pueden empezar a recogerse menos frecuentemente después de estos 7 días.

Dependiendo de la vía de administración, el perfil de eliminación es diferente y la interpretación de los datos clínicos también. Al igual que en la administración intratumoral, la falta de toxicidad tras la administración sistémica es alentadora. Solo se observó un estado febril leve después de la administración de la terapia y el análisis hematológico y bioquímico no mostró ningún cambio respecto a sus valores basales. Estos resultados sugieren que la dosis administrada puede ser aumentada en un futuro a través de un escalado de dosis. El aumento constante y permanente de los títulos de anticuerpos neutralizantes tan pronto como a las 72h posteriores a la administración y hasta al menos los 60d sugieren la posible replicación viral en el tumor. A diferencia del resultado obtenido después de la administración intratumoral, la eliminación viral sanguínea fue detectada a partir de una 1h tras la administración y hasta al menos los 10d posteriores a la administración. No se detectaron virus funcionales ni en orina ni en saliva en ninguno de los tiempos analizados, pero la viremia detectada sugiere la necesidad de contención biológica de los perros administrados con esta estrategia terapéutica.

En referencia a los resultados obtenidos en los dos perros inyectados con células infectadas con OCCAV, se puede concluir que la falta de toxicidad es alentadora y sugiere que tal vez un virus replicativo más potente puede ser administrado utilizando un sistema celular de transporte. Los datos de seguridad también son alentadores. En general, muchos factores deben ser considerados para determinar la duración del estudio. Estos incluyen el curso natural de infección del virus parental, la inmunidad preexistente, el estado inmune de los pacientes y, la potencia y selectividad del virus.

VIII. CONCLUSIONES

1. El sistema de transporte mediado por células de osteosarcoma canino protege al adenovirus oncolítico de la neutralización por los anticuerpos preformados. En un modelo xenoinjertado de osteosarcoma canino inmunizado con CAV2, la presencia de anticuerpos neutralizantes bloquea el adenovirus desnudo antes de alcanzar al tumor, reduciendo significativamente la biodisponibilidad de la dosis terapéutica administrada. Sin embargo, las células tumorales caninas D17 y Abrams pueden transportar de forma eficiente el adenovirus oncolítico al tumor e infectarlo en presencia de anticuerpos neutralizantes.
2. La utilización de células transportadoras tumorales como vehículos sistémicos de adenovirus oncolíticos reduce la transducción hepática murina, lo que sugiere que esta estrategia de transporte adenoviral puede prevenir de forma eficiente la toxicidad hepática, que es limitante en la administración sistémica de los adenovirus desnudos.
3. El sistema celular transportador de OCCAV presenta una mayor eficacia antitumoral respecto a la administración de OCCAV desnudo en diferentes protocolos de administración en modelos xenoinjertados de osteosarcoma canino. Además, esta estrategia de transporte sistémico es más efectivo incluso en presencia de anticuerpos neutralizantes anti-adenovirus.
4. La inmunosupresión con ciclofosfamida incrementa la actividad antitumoral de la administración sistémica de OCCAV desnudo, pero no favorece la actividad antitumoral demostrada por las células D17 infectadas con OCCAV.
5. En perros con osteosarcoma, la administración intratumoral y sistémica de células tumorales de osteosarcoma canino infectadas con OCCAV es bien tolerada, segura y factible de realizar.
6. Las células tumorales transportadoras de adenovirus oncolítico ya sean heterólogas alogénicas o xenogénicas son igualmente capaces de infectar a la célula tumoral diana en presencia de anticuerpos neutralizantes *in vivo*.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Aboudy, K. S., Brown, A., Rainov, N. G., Bower, K. A., Liu, S., Yang, W., Small, J. E., Herrlinger, U., Ourednik, V., Black, P. M., *et al.* (2000). Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 12846-12851.
- Adachi, Y., Reynolds, P. N., Yamamoto, M., Wang, M., Takayama, K., Matsubara, S., Muramatsu, T., and Curiel, D. T. (2001). A midkine promoter-based conditionally replicative adenovirus for treatment of pediatric solid tumors and bone marrow tumor purging. *Cancer Res* *61*, 7882-7888.
- Al-Mehdi, A. B., Tozawa, K., Fisher, A. B., Shientag, L., Lee, A., and Muschel, R. J. (2000). Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nature medicine* *6*, 100-102.
- Aleman, R., Balague, C., and Curiel, D. T. (2000). Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nature biotechnology* *18*, 723-727.
- Aleman, R., and Curiel, D. T. (2001). CAR-binding ablation does not change biodistribution and toxicity of adenoviral vectors. *Gene therapy* *8*, 1347-1353.
- Alexander, A. N., Huelsmeyer, M. K., Mitzey, A., Dubielzig, R. R., Kurzman, I. D., Macewen, E. G., and Vail, D. M. (2006). Development of an allogeneic whole-cell tumor vaccine expressing xenogeneic gp100 and its implementation in a phase II clinical trial in canine patients with malignant melanoma. *Cancer Immunol Immunother* *55*, 433-442.
- Arakawa, S., Jr., Hamami, G., Umezu, K., Kamidono, S., Ishigami, J., and Arakawa, S. (1987). Clinical trial of attenuated vaccinia virus AS strain in the treatment of advanced adenocarcinoma. Report on two cases. *Journal of cancer research and clinical oncology* *113*, 95-98.
- Asada, T. (1974). Treatment of human cancer with mumps virus. *Cancer* *34*, 1907-1928.
- Asano, T., and Kleinerman, E. S. (1993). Liposome-encapsulated MTP-PE: a novel biologic agent for cancer therapy. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* *14*, 286-292.
- Bangari, D. S., and Mittal, S. K. (2006). Current strategies and future directions for eluding adenoviral vector immunity. *Current gene therapy* *6*, 215-226.
- Bauerschmitz, G. J., Lam, J. T., Kanerva, A., Suzuki, K., Nettelbeck, D. M., Dmitriev, I., Krasnykh, V., Mikheeva, G. V., Barnes, M. N., Alvarez, R. D., *et al.* (2002). Treatment of ovarian cancer with a tropism modified oncolytic adenovirus. *Cancer research* *62*, 1266-1270.
- Benjamin, R., Helman, L., Meyers, P., and Reaman, G. (2001). A phase I/II dose escalation and activity study of intravenous injections of OCaP1 for subjects with refractory osteosarcoma metastatic to lung. *Human gene therapy* *12*, 1591-1593.
- Berg, J., Weinstein, M. J., Springfield, D. S., and Rand, W. M. (1995). Results of surgery and doxorubicin chemotherapy in dogs with osteosarcoma. *Journal of the American Veterinary Medical Association* *206*, 1555-1560.
- Bergman, P. J., MacEwen, E. G., Kurzman, I. D., Henry, C. J., Hammer, A. S., Knapp, D. W., Hale, A., Kruth, S. A., Klein, M. K., Klausner, J., *et al.* (1996). Amputation and carboplatin for treatment of dogs with osteosarcoma: 48 cases (1991 to 1993). *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* *10*, 76-81.
- Bischoff, J. R., Kirn, D. H., Williams, A., Heise, C., Horn, S., Muna, M., Ng, L., Nye, J. A., Sampson-Johannes, A., Fattaey, A., and McCormick, F. (1996). An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science (New York, NY)* *274*, 373-376.

- Bouvet, M., Fang, B., Ekmekcioglu, S., Ji, L., Bucana, C. D., Hamada, K., Grimm, E. A., and Roth, J. A. (1998). Suppression of the immune response to an adenovirus vector and enhancement of intratumoral transgene expression by low-dose etoposide. *Gene therapy* 5, 189-195.
- Cameron, M. D., Schmidt, E. E., Kerkvliet, N., Nadkarni, K. V., Morris, V. L., Groom, A. C., Chambers, A. F., and MacDonald, I. C. (2000). Temporal progression of metastasis in lung: cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency. *Cancer research* 60, 2541-2546.
- Canalis, E., McCarthy, T., and Centrella, M. (1988). Growth factors and the regulation of bone remodeling. *The Journal of clinical investigation* 81, 277-281.
- Cascallo, M., Alonso, M. M., Rojas, J. J., Perez-Gimenez, A., Fueyo, J., and Alemany, R. (2007). Systemic toxicity-efficacy profile of ICOVIR-5, a potent and selective oncolytic adenovirus based on the pRB pathway. *Mol Ther* 15, 1607-1615.
- Cascallo, M., Capella, G., Mazo, A., and Alemany, R. (2003). Ras-dependent oncolysis with an adenovirus VAI mutant. *Cancer research* 63, 5544-5550.
- Cascallo, M., Gros, A., Bayo, N., Serrano, T., Capella, G., and Alemany, R. (2006). Deletion of VAI and VAI RNA genes in the design of oncolytic adenoviruses. *Human gene therapy* 17, 929-940.
- Coffey, M. C., Strong, J. E., Forsyth, P. A., and Lee, P. W. (1998). Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway. *Science (New York, NY)* 282, 1332-1334.
- Cole, C., Qiao, J., Kottke, T., Diaz, R. M., Ahmed, A., Sanchez-Perez, L., Brunn, G., Thompson, J., Chester, J., and Vile, R. G. (2005). Tumor-targeted, systemic delivery of therapeutic viral vectors using hitchhiking on antigen-specific T cells. *Nature medicine* 11, 1073-1081.
- Coomber, B. L., Denton, J., Sylvestre, A., and Kruth, S. (1998). Blood vessel density in canine osteosarcoma. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire* 62, 199-204.
- Coukos, G., Makrigiannakis, A., Kang, E. H., Caparelli, D., Benjamin, I., Kaiser, L. R., Rubin, S. C., Albelda, S. M., and Molnar-Kimber, K. L. (1999). Use of carrier cells to deliver a replication-selective herpes simplex virus-1 mutant for the intraperitoneal therapy of epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 5, 1523-1537.
- Cuevas, Y., Hernandez-Alcoceba, R., Aragonés, J., Naranjo-Suarez, S., Castellanos, M. C., Esteban, M. A., Martin-Puig, S., Landazuri, M. O., and del Peso, L. (2003). Specific oncolytic effect of a new hypoxia-inducible factor-dependent replicative adenovirus on von Hippel-Lindau-defective renal cell carcinomas. *Cancer Res* 63, 6877-6884.
- Chillon, M., and Kremer, E. J. (2001). Trafficking and propagation of canine adenovirus vectors lacking a known integrin-interacting motif. *Human gene therapy* 12, 1815-1823.
- Chirmule, N., Propert, K., Magosin, S., Qian, Y., Qian, R., and Wilson, J. (1999). Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene therapy* 6, 1574-1583.
- Chu, R. L., Post, D. E., Khuri, F. R., and Van Meir, E. G. (2004). Use of replicating oncolytic adenoviruses in combination therapy for cancer. *Clin Cancer Res* 10, 5299-5312.
- Dernell WS, S. R., Withrow SJ (2001). Tumors of the skeletal system. In *Small animal clinical oncology*, M.E. Withrow SJ, ed. (Philadelphia: 2001), pp. 378-417

- DiPaolo, N., Ni, S., Gaggar, A., Strauss, R., Tuve, S., Li, Z. Y., Stone, D., Shayakhmetov, D., Kiviat, N., Toure, P., *et al.* (2006). Evaluation of adenovirus vectors containing serotype 35 fibers for vaccination. *Mol Ther* 13, 756-765.
- Ehrhart, N., Dernell, W. S., Hoffmann, W. E., Weigel, R. M., Powers, B. E., and Withrow, S. J. (1998). Prognostic importance of alkaline phosphatase activity in serum from dogs with appendicular osteosarcoma: 75 cases (1990-1996). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 213, 1002-1006.
- Feugeas, O., Guriec, N., Babin-Boilletot, A., Marcellin, L., Simon, P., Babin, S., Thyss, A., Hofman, P., Terrier, P., Kalifa, C., *et al.* (1996). Loss of heterozygosity of the RB gene is a poor prognostic factor in patients with osteosarcoma. *J Clin Oncol* 14, 467-472.
- Flint, A. F., U'Ren, L., Legare, M. E., Withrow, S. J., Dernell, W., and Hanneman, W. H. (2004). Overexpression of the erbB-2 proto-oncogene in canine osteosarcoma cell lines and tumors. *Veterinary pathology* 41, 291-296.
- Fuchs, B., and Pritchard, D. J. (2002). Etiology of osteosarcoma. *Clinical orthopaedics and related research*, 40-52.
- Fuerer, C., and Iggo, R. (2002). Adenoviruses with Tcf binding sites in multiple early promoters show enhanced selectivity for tumour cells with constitutive activation of the wnt signalling pathway. *Gene Ther* 9, 270-281.
- Fueyo, J., Gomez-Manzano, C., Alemany, R., Lee, P. S., McDonnell, T. J., Mitlianga, P., Shi, Y. X., Levin, V. A., Yung, W. K., and Kyritsis, A. P. (2000). A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene* 19, 2-12.
- Fujiwara, T., Urata, Y., and Tanaka, N. (2007). Telomerase-specific oncolytic virotherapy for human cancer with the hTERT promoter. *Current cancer drug targets* 7, 191-201.
- Fulci, G., Breymann, L., Gianni, D., Kurozumi, K., Rhee, S. S., Yu, J., Kaur, B., Louis, D. N., Weissleder, R., Caligiuri, M. A., and Chiocca, E. A. (2006). Cyclophosphamide enhances glioma virotherapy by inhibiting innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 12873-12878.
- Gahery-Segard, H., Farace, F., Godfrin, D., Gaston, J., Lengagne, R., Tursz, T., Boulanger, P., and Guillet, J. G. (1998). Immune response to recombinant capsid proteins of adenovirus in humans: antifiber and anti-penton base antibodies have a synergistic effect on neutralizing activity. *Journal of virology* 72, 2388-2397.
- Gamblin, R. M., Straw, R. C., Powers, B. E., Park, R. D., Bunge, M. M., and Withrow, S. J. (1995). Primary osteosarcoma distal to the antebrachio-carpal and tarsocrural joints in nine dogs (1980-1992). *Journal of the American Animal Hospital Association* 31, 86-91.
- Garcia-Castro, J., Martinez-Palacio, J., Lillo, R., Garcia-Sanchez, F., Alemany, R., Madero, L., Bueren, J. A., and Ramirez, M. (2005). Tumor cells as cellular vehicles to deliver gene therapies to metastatic tumors. *Cancer gene therapy* 12, 341-349.
- Garzotto, C. K., Berg, J., Hoffmann, W. E., and Rand, W. M. (2000). Prognostic significance of serum alkaline phosphatase activity in canine appendicular osteosarcoma. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 14, 587-592.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology* 36, 59-74.
- Grander, D. (1998). How do mutated oncogenes and tumor suppressor genes cause cancer? *Medical oncology (Northwood, London, England)* 15, 20-26.

- Guo, Z. S., Thorne, S. H., and Bartlett, D. L. (2008). Oncolytic virotherapy: molecular targets in tumor-selective replication and carrier cell-mediated delivery of oncolytic viruses. *Biochimica et biophysica acta* 1785, 217-231.
- Hakkarainen, T., Sarkioja, M., Lehenkari, P., Miettinen, S., Ylikomi, T., Suuronen, R., Desmond, R. A., Kanerva, A., and Hemminki, A. (2007). Human mesenchymal stem cells lack tumor tropism but enhance the antitumor activity of oncolytic adenoviruses in orthotopic lung and breast tumors. *Human gene therapy* 18, 627-641.
- Hallenbeck, P. L., Chang, Y. N., Hay, C., Golightly, D., Stewart, D., Lin, J., Phipps, S., and Chiang, Y. L. (1999). A novel tumor-specific replication-restricted adenoviral vector for gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Human gene therapy* 10, 1721-1733.
- Hamada, K., Desaki, J., Nakagawa, K., Zhang, T., Shirakawa, T., Gotoh, A., and Tagawa, M. (2007). Carrier cell-mediated delivery of a replication-competent adenovirus for cancer gene therapy. *Mol Ther* 15, 1121-1128.
- Harrington, K., Alvarez-Vallina, L., Crittenden, M., Gough, M., Chong, H., Diaz, R. M., Vassaux, G., Lemoine, N., and Vile, R. (2002). Cells as vehicles for cancer gene therapy: the missing link between targeted vectors and systemic delivery? *Human gene therapy* 13, 1263-1280.
- Hay, J. G. (2003). "Man's best friend": a new model system for cancer therapeutics? *Mol Ther* 7, 144-145.
- Hedley, S. J., Chen, J., Mountz, J. D., Li, J., Curiel, D. T., Korokhov, N., and Kovesdi, I. (2006). Targeted and shielded adenovectors for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 55, 1412-1419.
- Hemminki, A., Kanerva, A., Kremer, E. J., Bauerschmitz, G. J., Smith, B. F., Liu, B., Wang, M., Desmond, R. A., Keriel, A., Barnett, B., *et al.* (2003). A canine conditionally replicating adenovirus for evaluating oncolytic virotherapy in a syngeneic animal model. *Mol Ther* 7, 163-173.
- Hernandez-Alcoceba, R., Pihalja, M., Qian, D., and Clarke, M. F. (2002). New oncolytic adenoviruses with hypoxia- and estrogen receptor-regulated replication. *Hum Gene Ther* 13, 1737-1750.
- Hernandez-Alcoceba, R., Pihalja, M., Wicha, M. S., and Clarke, M. F. (2000). A novel, conditionally replicative adenovirus for the treatment of breast cancer that allows controlled replication of E1a-deleted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 11, 2009-2024.
- Heyman, S. J., Diefenderfer, D. L., Goldschmidt, M. H., and Newton, C. D. (1992). Canine axial skeletal osteosarcoma. A retrospective study of 116 cases (1986 to 1989). *Vet Surg* 21, 304-310.
- Hogge, G. S., Burkholder, J. K., Culp, J., Albertini, M. R., Dubielzig, R. R., Yang, N. S., and MacEwen, E. G. (1999). Preclinical development of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transfected melanoma cell vaccine using established canine cell lines and normal dogs. *Cancer gene therapy* 6, 26-36.
- Hong, S. S., Habib, N. A., Franqueville, L., Jensen, S., and Boulanger, P. A. (2003). Identification of adenovirus (ad) penton base neutralizing epitopes by use of sera from patients who had received conditionally replicative ad (add1520) for treatment of liver tumors. *Journal of virology* 77, 10366-10375.
- Honore, P., and Mantyh, P. W. (2000). Bone cancer pain: from mechanism to model to therapy. *Pain medicine (Malden, Mass)* 1, 303-309.

- Horino, K., Kindezelskii, A. L., Elner, V. M., Hughes, B. A., and Petty, H. R. (2001). Tumor cell invasion of model 3-dimensional matrices: demonstration of migratory pathways, collagen disruption, and intercellular cooperation. *Faseb J* 15, 932-939.
- Hsieh, C. L., Yang, L., Miao, L., Yeung, F., Kao, C., Yang, H., Zhau, H. E., and Chung, L. W. (2002). A novel targeting modality to enhance adenoviral replication by vitamin D(3) in androgen-independent human prostate cancer cells and tumors. *Cancer research* 62, 3084-3092.
- Huang, P. I., Chang, J. F., Kirn, D. H., and Liu, T. C. (2009). Targeted genetic and viral therapy for advanced head and neck cancers. *Drug discovery today* 14, 570-578.
- Huang, X. F., Ren, W., Rollins, L., Pittman, P., Shah, M., Shen, L., Gu, Q., Strube, R., Hu, F., and Chen, S. Y. (2003). A broadly applicable, personalized heat shock protein-mediated oncolytic tumor vaccine. *Cancer Res* 63, 7321-7329.
- Huebner, R. J., Rowe, W. P., Schatten, W. E., Smith, R. R., and Thomas, L. B. (1956). Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix. *Cancer* 9, 1211-1218.
- Iankov, I. D., Blechacz, B., Liu, C., Schmeckpeper, J. D., Tarara, J. E., Federspiel, M. J., Caplice, N., and Russell, S. J. (2007). Infected cell carriers: a new strategy for systemic delivery of oncolytic measles viruses in cancer virotherapy. *Mol Ther* 15, 114-122.
- Ikeda, K., Ichikawa, T., Wakimoto, H., Silver, J. S., Deisboeck, T. S., Finkelstein, D., Harsh, G. R. t., Louis, D. N., Bartus, R. T., Hochberg, F. H., and Chiocca, E. A. (1999). Oncolytic virus therapy of multiple tumors in the brain requires suppression of innate and elicited antiviral responses. *Nature medicine* 5, 881-887.
- Ilett, E. J., Prestwich, R. J., Kottke, T., Errington, F., Thompson, J. M., Harrington, K. J., Pandha, H. S., Coffey, M., Selby, P. J., Vile, R. G., and Melcher, A. A. (2009). Dendritic cells and T cells deliver oncolytic reovirus for tumour killing despite pre-existing antiviral immunity. *Gene therapy* 16, 689-699.
- Jakubczak, J. L., Ryan, P., Gorziglia, M., Clarke, L., Hawkins, L. K., Hay, C., Huang, Y., Kaloss, M., Marinov, A., Phipps, S., *et al.* (2003). An oncolytic adenovirus selective for retinoblastoma tumor suppressor protein pathway-defective tumors: dependence on E1A, the E2F-1 promoter, and viral replication for selectivity and efficacy. *Cancer Res* 63, 1490-1499.
- Jevremovic, D., Gulati, R., Hennig, I., Diaz, R. M., Cole, C., Kleppe, L., Cosset, F. L., Simari, R. D., and Vile, R. G. (2004). Use of blood outgrowth endothelial cells as virus-producing vectors for gene delivery to tumors. *American journal of physiology* 287, H494-500.
- Johnson, A. S., Couto, C. G., and Weghorst, C. M. (1998). Mutation of the p53 tumor suppressor gene in spontaneously occurring osteosarcomas of the dog. *Carcinogenesis* 19, 213-217.
- Johnson, L., Shen, A., Boyle, L., Kunich, J., Pandey, K., Lemmon, M., Hermiston, T., Giedlin, M., McCormick, F., and Fattaey, A. (2002). Selectively replicating adenoviruses targeting deregulated E2F activity are potent, systemic antitumor agents. *Cancer Cell* 1, 325-337.
- Jooss, K., Yang, Y., and Wilson, J. M. (1996). Cyclophosphamide diminishes inflammation and prolongs transgene expression following delivery of adenoviral vectors to mouse liver and lung. *Human gene therapy* 7, 1555-1566.
- Juillard, V., Villefroy, P., Godfrin, D., Pavirani, A., Venet, A., and Guillet, J. G. (1995). Long-term humoral and cellular immunity induced by a single immunization with replication-

- defective adenovirus recombinant vector. *European journal of immunology* 25, 3467-3473.
- Junt, T., Moseman, E. A., Iannacone, M., Massberg, S., Lang, P. A., Boes, M., Fink, K., Henrickson, S. E., Shayakhmetov, D. M., Di Paolo, N. C., *et al.* (2007). Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. *Nature* 450, 110-114.
- Kelly, E., and Russell, S. J. (2007). History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering. *Mol Ther* 15, 651-659.
- Kirpensteijn, J., Kik, M., Rutteman, G. R., and Teske, E. (2002). Prognostic significance of a new histologic grading system for canine osteosarcoma. *Veterinary pathology* 39, 240-246.
- Kirpensteijn, J., van den Bos, R., and Endenburg, N. (1999). Adaptation of dogs to the amputation of a limb and their owners' satisfaction with the procedure. *The Veterinary record* 144, 115-118.
- Klonjkowski, B., Gilardi-Hebenstreit, P., Hadchouel, J., Randrianarison, V., Boutin, S., Yeh, P., Perricaudet, M., and Kremer, E. J. (1997). A recombinant E1-deleted canine adenoviral vector capable of transduction and expression of a transgene in human-derived cells and in vivo. *Human gene therapy* 8, 2103-2115.
- Ko, S. C., Cheon, J., Kao, C., Gotoh, A., Shirakawa, T., Sikes, R. A., Karsenty, G., and Chung, L. W. (1996). Osteocalcin promoter-based toxic gene therapy for the treatment of osteosarcoma in experimental models. *Cancer research* 56, 4614-4619.
- Komarova, S., Kawakami, Y., Stoff-Khalili, M. A., Curiel, D. T., and Pereboeva, L. (2006). Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses. *Molecular cancer therapeutics* 5, 755-766.
- Kottke, T., Diaz, R. M., Kaluza, K., Pulido, J., Galivo, F., Wongthida, P., Thompson, J., Willmon, C., Barber, G. N., Chester, J., *et al.* (2008). Use of biological therapy to enhance both virotherapy and adoptive T-cell therapy for cancer. *Mol Ther* 16, 1910-1918.
- Kow, K., Thamm, D. H., Terry, J., Grunerud, K., Bailey, S. M., Withrow, S. J., and Lana, S. E. (2008). Impact of telomerase status on canine osteosarcoma patients. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 22, 1366-1372.
- Kraegel, S. A., Madewell, B. R., Simonson, E., and Gregory, C. R. (1991). Osteogenic sarcoma and cisplatin chemotherapy in dogs: 16 cases (1986-1989). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 199, 1057-1059.
- Kremer, E. J., Boutin, S., Chillon, M., and Danos, O. (2000). Canine adenovirus vectors: an alternative for adenovirus-mediated gene transfer. *Journal of virology* 74, 505-512.
- Kurozumi, K., Hardcastle, J., Thakur, R., Yang, M., Christoforidis, G., Fulci, G., Hochberg, F. H., Weissleder, R., Carson, W., Chiocca, E. A., and Kaur, B. (2007). Effect of tumor microenvironment modulation on the efficacy of oncolytic virus therapy. *Journal of the National Cancer Institute* 99, 1768-1781.
- Lanciotti, J., Song, A., Doukas, J., Sosnowski, B., Pierce, G., Gregory, R., Wadsworth, S., and O'Riordan, C. (2003). Targeting adenoviral vectors using heterofunctional polyethylene glycol FGF2 conjugates. *Mol Ther* 8, 99-107.
- LaRue, S. M., Withrow, S. J., and Wrigley, R. H. (1986). Radiographic bone surveys in the evaluation of primary bone tumors in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 188, 514-516.

- Levine, R. A., and Fleischli, M. A. (2000). Inactivation of p53 and retinoblastoma family pathways in canine osteosarcoma cell lines. *Veterinary pathology* 37, 54-61.
- Li, X., Jung, C., Liu, Y. H., Bae, K. H., Zhang, Y. P., Zhang, H. J., Vanderputten, D., Jeng, M. H., Gardner, T. A., and Kao, C. (2006). Anti-tumor efficacy of a transcriptional replication-competent adenovirus, Ad-OC-E1a, for osteosarcoma pulmonary metastasis. *The journal of gene medicine* 8, 679-689.
- Li, Y., Yu, D. C., Chen, Y., Amin, P., Zhang, H., Nguyen, N., and Henderson, D. R. (2001). A hepatocellular carcinoma-specific adenovirus variant, CV890, eliminates distant human liver tumors in combination with doxorubicin. *Cancer Res* 61, 6428-6436.
- Liebau, C., Roesel, C., Schmidt, S., Karreman, C., Prisack, J. B., Bojar, H., Merk, H., Wolfram, N., and Baltzer, A. W. (2004). Immunotherapy by gene transfer with plasmids encoding IL-12/IL-18 is superior to IL-23/IL-18 gene transfer in a rat osteosarcoma model. *Anticancer research* 24, 2861-2867.
- Liotta, L. A., and Kohn, E. C. (2001). The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 411, 375-379.
- Liu, T. C., Galanis, E., and Kirn, D. (2007). Clinical trial results with oncolytic virotherapy: a century of promise, a decade of progress. *Nature clinical practice* 4, 101-117.
- Lun, X. Q., Jang, J. H., Tang, N., Deng, H., Head, R., Bell, J. C., Stojdl, D. F., Nutt, C. L., Senger, D. L., Forsyth, P. A., and McCart, J. A. (2009). Efficacy of systemically administered oncolytic vaccinia virotherapy for malignant gliomas is enhanced by combination therapy with rapamycin or cyclophosphamide. *Clin Cancer Res* 15, 2777-2788.
- MacEwen, E. G., Kurzman, I. D., Rosenthal, R. C., Smith, B. W., Manley, P. A., Roush, J. K., and Howard, P. E. (1989). Therapy for osteosarcoma in dogs with intravenous injection of liposome-encapsulated muramyl tripeptide. *Journal of the National Cancer Institute* 81, 935-938.
- Majem, M., Cascallo, M., Bayo-Puxan, N., Mesia, R., Germa, J. R., and Alemany, R. (2006). Control of E1A under an E2F-1 promoter insulated with the myotonic dystrophy locus insulator reduces the toxicity of oncolytic adenovirus Ad-Delta24RGD. *Cancer gene therapy* 13, 696-705.
- Martuza, R. L., Malick, A., Markert, J. M., Ruffner, K. L., and Coen, D. M. (1991). Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science (New York, NY)* 252, 854-856.
- Mathis, J. M., Stoff-Khalili, M. A., and Curiel, D. T. (2005). Oncolytic adenoviruses - selective retargeting to tumor cells. *Oncogene* 24, 7775-7791.
- Matsubara, S., Wada, Y., Gardner, T. A., Egawa, M., Park, M. S., Hsieh, C. L., Zhou, H. E., Kao, C., Kamidono, S., Gillenwater, J. Y., and Chung, L. W. (2001). A conditional replication-competent adenoviral vector, Ad-OC-E1a, to cotarget prostate cancer and bone stroma in an experimental model of androgen-independent prostate cancer bone metastasis. *Cancer Res* 61, 6012-6019.
- Mendoza, S., Konishi, T., Dernell, W. S., Withrow, S. J., and Miller, C. W. (1998). Status of the p53, Rb and MDM2 genes in canine osteosarcoma. *Anticancer research* 18, 4449-4453.
- Milton, G. W., and Brown, M. M. (1966). The limited role of attenuated smallpox virus in the management of advanced malignant melanoma. *The Australian and New Zealand journal of surgery* 35, 286-290.
- Misdorp, W., and Hart, A. A. (1979). Some prognostic and epidemiologic factors in canine osteosarcoma. *Journal of the National Cancer Institute* 62, 537-545.

- Molinier-Frenkel, V., Lengagne, R., Gaden, F., Hong, S. S., Choppin, J., Gahery-Segard, H., Boulanger, P., and Guillet, J. G. (2002). Adenovirus hexon protein is a potent adjuvant for activation of a cellular immune response. *Journal of virology* *76*, 127-135.
- Mueller, F., Fuchs, B., and Kaser-Hotz, B. (2007). Comparative biology of human and canine osteosarcoma. *Anticancer research* *27*, 155-164.
- Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S. N., *et al.* (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* *410*, 50-56.
- Mullins, M. N., Lana, S. E., Dernel, W. S., Ogilvie, G. K., Withrow, S. J., and Ehrhart, E. J. (2004). Cyclooxygenase-2 expression in canine appendicular osteosarcomas. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* *18*, 859-865.
- Muruve, D. A., Barnes, M. J., Stillman, I. E., and Libermann, T. A. (1999). Adenoviral gene therapy leads to rapid induction of multiple chemokines and acute neutrophil-dependent hepatic injury in vivo. *Human gene therapy* *10*, 965-976.
- Muruve, D. A., Petrilli, V., Zaiss, A. K., White, L. R., Clark, S. A., Ross, P. J., Parks, R. J., and Tschopp, J. (2008). The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature* *452*, 103-107.
- Nettelbeck, D. M., Rivera, A. A., Balague, C., Alemany, R., and Curiel, D. T. (2002). Novel oncolytic adenoviruses targeted to melanoma: specific viral replication and cytolysis by expression of E1A mutants from the tyrosinase enhancer/promoter. *Cancer Res* *62*, 4663-4670.
- Nettelbeck, D. M., Rivera, A. A., Davydova, J., Dieckmann, D., Yamamoto, M., and Curiel, D. T. (2003). Cyclooxygenase-2 promoter for tumour-specific targeting of adenoviral vectors to melanoma. *Melanoma research* *13*, 287-292.
- Ogilvie, G. K., Straw, R. C., Jameson, V. J., Walters, L. M., Lafferty, M. H., Powers, B. E., and Withrow, S. J. (1993). Evaluation of single-agent chemotherapy for treatment of clinically evident osteosarcoma metastases in dogs: 45 cases (1987-1991). *Journal of the American Veterinary Medical Association* *202*, 304-306.
- Ong, H. T., Hasegawa, K., Dietz, A. B., Russell, S. J., and Peng, K. W. (2007). Evaluation of T cells as carriers for systemic measles virotherapy in the presence of antiviral antibodies. *Gene therapy* *14*, 324-333.
- Paoloni, M., and Khanna, C. (2008). Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nature reviews* *8*, 147-156.
- Parato, K. A., Senger, D., Forsyth, P. A., and Bell, J. C. (2005). Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. *Nat Rev Cancer* *5*, 965-976.
- Paul, C. P., Everts, M., Glasgow, J. N., Dent, P., Fisher, P. B., Ulasov, I. V., Lesniak, M. S., Stoff-Khalili, M. A., Roth, J. C., Preuss, M. A., *et al.* (2008). Characterization of infectivity of knob-modified adenoviral vectors in glioma. *Cancer biology & therapy* *7*, 786-793.
- Pfirschke, C., and Schirrmacher, V. (2009). Cross-infection of tumor cells by contact with T lymphocytes loaded with Newcastle disease virus. *International journal of oncology* *34*, 951-962.
- Post, D. E., Sandberg, E. M., Kyle, M. M., Devi, N. S., Brat, D. J., Xu, Z., Tighiouart, M., and Van Meir, E. G. (2007). Targeted cancer gene therapy using a hypoxia inducible factor dependent oncolytic adenovirus armed with interleukin-4. *Cancer Res* *67*, 6872-6881.

- Power, A. T., and Bell, J. C. (2007). Cell-based delivery of oncolytic viruses: a new strategic alliance for a biological strike against cancer. *Mol Ther* *15*, 660-665.
- Power, A. T., and Bell, J. C. (2008). Taming the Trojan horse: optimizing dynamic carrier cell/oncolytic virus systems for cancer biotherapy. *Gene therapy* *15*, 772-779.
- Power, A. T., Wang, J., Falls, T. J., Paterson, J. M., Parato, K. A., Lichty, B. D., Stojdl, D. F., Forsyth, P. A., Atkins, H., and Bell, J. C. (2007). Carrier cell-based delivery of an oncolytic virus circumvents antiviral immunity. *Mol Ther* *15*, 123-130.
- Prestwich, R. J., Errington, F., Diaz, R. M., Pandha, H. S., Harrington, K. J., Melcher, A. A., and Vile, R. G. (2009). The Case of Oncolytic Viruses versus the Immune System: Waiting on the Judgment of Solomon. *Human gene therapy*.
- Qiao, J., Kottke, T., Willmon, C., Galivo, F., Wongthida, P., Diaz, R. M., Thompson, J., Ryno, P., Barber, G. N., Chester, J., *et al.* (2008a). Purging metastases in lymphoid organs using a combination of antigen-nonspecific adoptive T cell therapy, oncolytic virotherapy and immunotherapy. *Nature medicine* *14*, 37-44.
- Qiao, J., Wang, H., Kottke, T., Diaz, R. M., Willmon, C., Hudacek, A., Thompson, J., Parato, K., Bell, J., Naik, J., *et al.* (2008b). Loading of oncolytic vesicular stomatitis virus onto antigen-specific T cells enhances the efficacy of adoptive T-cell therapy of tumors. *Gene therapy* *15*, 604-616.
- Raykov, Z., Balboni, G., Aprahamian, M., and Rommelaere, J. (2004). Carrier cell-mediated delivery of oncolytic parvoviruses for targeting metastases. *International journal of cancer* *109*, 742-749.
- Rodriguez, R., Schuur, E. R., Lim, H. Y., Henderson, G. A., Simons, J. W., and Henderson, D. R. (1997). Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Res* *57*, 2559-2563.
- Roenigk, H. H., Jr., Deodhar, S., St Jacques, R., and Burdick, K. (1974). Immunotherapy of malignant melanoma with vaccinia virus. *Archives of dermatology* *109*, 668-673.
- Ryan, P. C., Jakubczak, J. L., Stewart, D. A., Hawkins, L. K., Cheng, C., Clarke, L. M., Ganesh, S., Hay, C., Huang, Y., Kaloss, M., *et al.* (2004). Antitumor efficacy and tumor-selective replication with a single intravenous injection of OAS403, an oncolytic adenovirus dependent on two prevalent alterations in human cancer. *Cancer gene therapy* *11*, 555-569.
- Sanders, R. P., Drissi, R., Billups, C. A., Daw, N. C., Valentine, M. B., and Dome, J. S. (2004). Telomerase expression predicts unfavorable outcome in osteosarcoma. *J Clin Oncol* *22*, 3790-3797.
- Schnell, M. A., Zhang, Y., Tazelaar, J., Gao, G. P., Yu, Q. C., Qian, R., Chen, S. J., Varnavski, A. N., LeClair, C., Raper, S. E., and Wilson, J. M. (2001). Activation of innate immunity in nonhuman primates following intraportal administration of adenoviral vectors. *Mol Ther* *3*, 708-722.
- Schoehn, G., El Bakkouri, M., Fabry, C. M., Billet, O., Estrozi, L. F., Le, L., Curiel, D. T., Kajava, A. V., Ruigrok, R. W., and Kremer, E. J. (2008). Three-dimensional structure of canine adenovirus serotype 2 capsid. *Journal of virology* *82*, 3192-3203.
- Schulick, A. H., Vassalli, G., Dunn, P. F., Dong, G., Rade, J. J., Zamarron, C., and Dichek, D. A. (1997). Established immunity precludes adenovirus-mediated gene transfer in rat carotid arteries. Potential for immunosuppression and vector engineering to overcome barriers of immunity. *The Journal of clinical investigation* *99*, 209-219.
- Seiradake, E., Henaff, D., Wodrich, H., Billet, O., Perreau, M., Hippert, C., Mennechet, F., Schoehn, G., Lortat-Jacob, H., Dreja, H., *et al.* (2009). The cell adhesion molecule

- "CAR" and sialic acid on human erythrocytes influence adenovirus in vivo biodistribution. *PLoS pathogens* *5*, e1000277.
- Shapiro, W., Fossum, T. W., Kitchell, B. E., Couto, C. G., and Theilen, G. H. (1988). Use of cisplatin for treatment of appendicular osteosarcoma in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* *192*, 507-511.
- Shimizu, Y., Hasumi, K., Okudaira, Y., Yamanishi, K., and Takahashi, M. (1988). Immunotherapy of advanced gynecologic cancer patients utilizing mumps virus. *Cancer detection and prevention* *12*, 487-495.
- Shirakawa, T., Hamada, K., Zhang, Z., Okada, H., Tagawa, M., Kamidono, S., Kawabata, M., and Gotoh, A. (2004). A cox-2 promoter-based replication-selective adenoviral vector to target the cox-2-expressing human bladder cancer cells. *Clin Cancer Res* *10*, 4342-4348.
- Sica, A., Schioppa, T., Mantovani, A., and Allavena, P. (2006). Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* *42*, 717-727.
- Sinkovics, J., and Horvath, J. (1993). New developments in the virus therapy of cancer: a historical review. *Intervirology* *36*, 193-214.
- Smith-Franklin, B. A., Keele, B. F., Tew, J. G., Gartner, S., Szakal, A. K., Estes, J. D., Thacker, T. C., and Burton, G. F. (2002). Follicular dendritic cells and the persistence of HIV infectivity: the role of antibodies and Fc γ receptors. *J Immunol* *168*, 2408-2414.
- Smith, B. F., Curiel, D. T., Ternovoi, V. V., Borovjagin, A. V., Baker, H. J., Cox, N., and Siegal, G. P. (2006). Administration of a conditionally replicative oncolytic canine adenovirus in normal dogs. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals* *21*, 601-606.
- Smith, T., Idamakanti, N., Kylefjord, H., Rollence, M., King, L., Kaloss, M., Kaleko, M., and Stevenson, S. C. (2002). In vivo hepatic adenoviral gene delivery occurs independently of the coxsackievirus-adenovirus receptor. *Mol Ther* *5*, 770-779.
- Smith, T. A., White, B. D., Gardner, J. M., Kaleko, M., and McClelland, A. (1996). Transient immunosuppression permits successful repetitive intravenous administration of an adenovirus vector. *Gene therapy* *3*, 496-502.
- Soudais, C., Boutin, S., Hong, S. S., Chillon, M., Danos, O., Bergelson, J. M., Boulanger, P., and Kremer, E. J. (2000). Canine adenovirus type 2 attachment and internalization: coxsackievirus-adenovirus receptor, alternative receptors, and an RGD-independent pathway. *Journal of virology* *74*, 10639-10649.
- Southam, C. M. (1960). Present status of oncolytic virus studies. *Transactions of the New York Academy of Sciences* *22*, 657-673.
- Southam, C. M., and Moore, A. E. (1951). West Nile, Ilheus, and Bunyamwera virus infections in man. *The American journal of tropical medicine and hygiene* *31*, 724-741.
- Steel, J. C., Cavanagh, H. M., Burton, M. A., and Kalle, W. H. (2004). Microsphere-liposome complexes protect adenoviral vectors from neutralising antibody without losses in transfection efficiency, in-vitro. *The Journal of pharmacy and pharmacology* *56*, 1371-1378.
- Stojdl, D. F., Lichty, B., Knowles, S., Marius, R., Atkins, H., Sonenberg, N., and Bell, J. C. (2000). Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nature medicine* *6*, 821-825.
- Straw, R. C., Withrow, S. J., Richter, S. L., Powers, B. E., Klein, M. K., Postorino, N. C., LaRue, S. M., Ogilvie, G. K., Vail, D. M., Morrison, W. B., and et al. (1991). Amputation

- and cisplatin for treatment of canine osteosarcoma. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 5, 205-210.
- Szelechowski, M., Fournier, A., Richardson, J., Eloit, M., and Klonjowski, B. (2009). Functional organization of the major late transcriptional unit of canine adenovirus type 2. *The Journal of general virology* 90, 1215-1223.
- Thomas, M. A., Spencer, J. F., La Regina, M. C., Dhar, D., Tollefson, A. E., Toth, K., and Wold, W. S. (2006). Syrian hamster as a permissive immunocompetent animal model for the study of oncolytic adenovirus vectors. *Cancer research* 66, 1270-1276.
- Thomas, M. A., Spencer, J. F., Toth, K., Sagartz, J. E., Phillips, N. J., and Wold, W. S. (2008). Immunosuppression enhances oncolytic adenovirus replication and antitumor efficacy in the Syrian hamster model. *Mol Ther* 16, 1665-1673.
- Thompson, J. P., and Fugent, M. J. (1992). Evaluation of survival times after limb amputation, with and without subsequent administration of cisplatin, for treatment of appendicular osteosarcoma in dogs: 30 cases (1979-1990). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 200, 531-533.
- Thorne, S. H., Negrin, R. S., and Contag, C. H. (2006). Synergistic antitumor effects of immune cell-viral biotherapy. *Science (New York, NY)* 311, 1780-1784.
- Tsai, V., Johnson, D. E., Rahman, A., Wen, S. F., LaFace, D., Philopena, J., Nery, J., Zepeda, M., Maneval, D. C., Demers, G. W., and Ralston, R. (2004). Impact of human neutralizing antibodies on antitumor efficacy of an oncolytic adenovirus in a murine model. *Clin Cancer Res* 10, 7199-7206.
- Tsukuda, K., Wiewrodt, R., Molnar-Kimber, K., Jovanovic, V. P., and Amin, K. M. (2002). An E2F-responsive replication-selective adenovirus targeted to the defective cell cycle in cancer cells: potent antitumoral efficacy but no toxicity to normal cell. *Cancer Res* 62, 3438-3447.
- van Leeuwen, I. S., Cornelisse, C. J., Misdorp, W., Goedegebuure, S. A., Kirpensteijn, J., and Rutteman, G. R. (1997). P53 gene mutations in osteosarcomas in the dog. *Cancer letters* 111, 173-178.
- Varnavski, A. N., Calcedo, R., Bove, M., Gao, G., and Wilson, J. M. (2005). Evaluation of toxicity from high-dose systemic administration of recombinant adenovirus vector in vector-naive and pre-immunized mice. *Gene therapy* 12, 427-436.
- Varnavski, A. N., Zhang, Y., Schnell, M., Tazelaar, J., Louboutin, J. P., Yu, Q. C., Bagg, A., Gao, G. P., and Wilson, J. M. (2002). Preexisting immunity to adenovirus in rhesus monkeys fails to prevent vector-induced toxicity. *Journal of virology* 76, 5711-5719.
- Vlachaki, M. T., Hernandez-Garcia, A., Ittmann, M., Chhikara, M., Aguilar, L. K., Zhu, X., Teh, B. S., Butler, E. B., Woo, S., Thompson, T. C., *et al.* (2002). Impact of preimmunization on adenoviral vector expression and toxicity in a subcutaneous mouse cancer model. *Mol Ther* 6, 342-348.
- Wang, L. L. (2005). Biology of osteogenic sarcoma. *Cancer journal (Sudbury, Mass)* 11, 294-305.
- Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323-330.
- Weller, R. E., Pool, R. R., and Hornof, W. J. (1979). Multiple skeletal metastases of osteogenic sarcoma in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 175, 56-60.
- Willmon, C., Harrington, K., Kottke, T., Prestwich, R., Melcher, A., and Vile, R. (2009). Cell Carriers for Oncolytic Viruses: Fed Ex for Cancer Therapy. *Mol Ther.*

- Wirth, T., Zender, L., Schulte, B., Mundt, B., Plentz, R., Rudolph, K. L., Manns, M., Kubicka, S., and Kuhnel, F. (2003). A telomerase-dependent conditionally replicating adenovirus for selective treatment of cancer. *Cancer Res* 63, 3181-3188.
- Withrow, S. J., Powers, B. E., Straw, R. C., and Wilkins, R. M. (1991). Comparative aspects of osteosarcoma. Dog versus man. *Clinical orthopaedics and related research*, 159-168.
- Wohlfart, C. (1988). Neutralization of adenoviruses: kinetics, stoichiometry, and mechanisms. *Journal of virology* 62, 2321-2328.
- Worgall, S., Wolff, G., Falck-Pedersen, E., and Crystal, R. G. (1997). Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following in vivo administration. *Human gene therapy* 8, 37-44.
- Wrigley, R. H. (2000). Malignant versus nonmalignant bone disease. *The Veterinary clinics of North America* 30, 315-347, vi-vii.
- Yang, Y., Li, Q., Ertl, H. C., and Wilson, J. M. (1995). Cellular and humoral immune responses to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses. *Journal of virology* 69, 2004-2015.
- Yu, D. C., Chen, Y., Seng, M., Dilley, J., and Henderson, D. R. (1999). The addition of adenovirus type 5 region E3 enables calydon virus 787 to eliminate distant prostate tumor xenografts. *Cancer Res* 59, 4200-4203.
- Zaiss, A. K., Machado, H. B., and Herschman, H. R. (2009a). The influence of innate and pre-existing immunity on adenovirus therapy. *Journal of cellular biochemistry*.
- Zaiss, A. K., Vilaysane, A., Cotter, M. J., Clark, S. A., Meijndert, H. C., Colarusso, P., Yates, R. M., Petrilli, V., Tschopp, J., and Muruve, D. A. (2009b). Antiviral antibodies target adenovirus to phagolysosomes and amplify the innate immune response. *J Immunol* 182, 7058-7068.
- Zheng, S., Ulasov, I. V., Han, Y., Tyler, M. A., Zhu, Z. B., and Lesniak, M. S. (2007). Fiber-knob modifications enhance adenoviral tropism and gene transfer in malignant glioma. *The journal of gene medicine* 9, 151-160.
- Zhu, J., Huang, X., and Yang, Y. (2007). Innate immune response to adenoviral vectors is mediated by both Toll-like receptor-dependent and -independent pathways. *Journal of virology* 81, 3170-3180.

