



Universidad de Navarra

Facultad de Ciencias

*Adenovirus Oncolíticos como estrategia terapéutica para
tumores del sistema nervioso central*

Beatriz Vera Cano

Pamplona, 2017



Universidad de Navarra

Facultad de Ciencias

*Adenovirus Oncolíticos como estrategia terapéutica para
tumores del sistema nervioso central*

Memoria presentada por D^a. Beatriz Vera Cano para aspirar al grado de Doctor por la
Universidad de Navarra

El presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Pediatría
de CUN y autorizo su presentación ante el Tribunal que lo ha de juzgar.

Pamplona, 5 de diciembre de 2016

Dra. Marta Alonso Roldán

Dr. Javier Sáez Castresana

A mi madre

A mi padre

A Iñaki

Este trabajo ha sido posible gracias a muchas personas, que de un modo u otro han facilitado la realización de esta Tesis y a las que estoy enormemente agradecida.

En primer lugar, quisiera agradecer a Javier por haberme permitido realizar la tesis en el tema que más me preocupaba e interesaba. Por su calidad humana y el tiempo que ha dedicado para darme consejos y hablar de muchos temas, tanto profesionales como personales. Le doy las gracias por haberme puesto en contacto con Marta donde finalmente he llevado a cabo la tesis, en su laboratorio de tumores cerebrales del CIMA.

Le agradezco a Marta por su acogida y dedicación y también al departamento de Pediatría de CUN al que ella pertenece. Le muestro mi agradecimiento por su generosidad al brindarme la oportunidad de poder recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, amistad y afecto, fundamentales para la concreción de este trabajo, por enseñarme a enfrentar los obstáculos con alegría y enseñarme que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr objetivos. Porque en definitiva, ha sido ella quien ha guiado mi trabajo y con la que he llegado a buen puerto.

Estos años me han permitido madurar mucho más, aprender lo bueno y lo malo de la investigación, superarme frente a las adversidades pero también vivir cosas maravillosas como por ejemplo el torneo de pádel o la carrera solidaria para conseguir “fondos” para la investigación de estos tumores tan malignos. Además de todo esto, hemos trabajado, y mucho. Hemos conseguido publicar diferentes papers, entre ellos, tengo uno como primera autora y otros tantos por el apoyo que he dado a mis compañeros, al igual que ellos me han apoyado a mí.

Por ello, me gustaría agradecer a mis compañeros del departamento de la Universidad como Javier y mis compañeros del CIMA, Patricia, Marisol, Naiara, Arlet y Enric.

A Patricia y Marisol porque son las que me han enseñado a pensar en la solución de los problemas del día a día, por darme aliento cuando no salía nada y por su sonrisa de las mañanas cuando todo parecía mal. A ambas, por su ayuda en el aprendizaje de nuevas técnicas, gracias por compartir inquietudes, éxitos y fracasos durante los experimentos realizados.

Naiara, por estar las dos, codo con codo, en los experimentos más duros y más difíciles que a pesar de eso, nos salieron con éxito. Por pensar, cabeza con cabeza lo que no estaba saliendo bien y por reírnos cuando todo era un desastre, gracias.

A Arlet, por su buen humor en todas las situaciones, por sus valiosas sugerencias y su ayuda durante el desarrollo de este trabajo.

Por otro lado, también quisiera agradecer a Javier Mata, mi jefe del SGI. Gracias a él he podido finalizar la tesis ya que no he contado con ninguna beca. También agradezco a Gabriel Canel, mi otro jefe de la CUN. Gracias a ambos por su comprensión y haberme facilitado un horario flexible para poder compaginar ambos trabajos y no dejar ninguno de lado. Tampoco se me olvida José Ramón Azanza, por su interés y su aliento.

Agradezco a mis compañeros de trabajo del SGI y de la UCEC de la CUN, sobretodo, Estefanía, Raquel, Ainhoa y José Miguel por apoyarme y animarme todos los días.

A todos aquellos que, aunque no hayan estado conmigo día a día, me han apoyado con su interés por mí y mi trabajo, animándome cuando más lo necesitaba, en especial a los padres de Iñaki, Asun y Carlos.

Gracias a mis padres, mis tíos, mis primos, mi abuela y toda mi familia por su preocupación y su apoyo incondicional, por animarme y por su paciencia en los peores momentos.

Gracias a Iñaki, porque sin tu paciencia, apoyo, ayuda, abrazos y besos en los momentos más duros y difíciles, no lo hubiera conseguido.

Y sobre todo, gracias a ti, mamá. Por estar siempre conmigo, por tus abrazos cuando más lo necesitaba, por escucharme incondicionalmente y por tu manera de animarme.

Sin ninguno de todos vosotros no lo hubiera logrado. Gracias.

Muchísimas gracias a todos, de corazón.

Abreviaturas

415p	Nucleótido 415 del genoma
$\alpha v \beta 3$	Integrina $\beta 3$
$\alpha v \beta 5$	Integrina $\beta 5$
$\Delta 24$	Delección de 24 pares de bases
Ac	Anticuerpo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AKT	Del inglés, Alpha serine/threonine-protein kinase
ALT	Alargamiento alternativo de los telómeros
ALT	Alanina aminotransferasa
APL	Fosfatasa alcalina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AST	Aspartato aminotransferasa
ATCC	Del inglés, American Type Culture Collection
ATRT	Tumor teratoide/rabdoide atípico
B27	Suplemento libre de FBS para mantenimiento de neuroesferas
BCNU	Carmustina
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
BRT	Tumores retinoblastoma trilateral
BSA	Albúmina de suero bovino
BTRC	Del inglés, Beta-Transducin Repeat Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase
CAR	Receptor de Adenovirus y virus Coxsackie
CBTRUS	Central Brain Tumor Registry of the United States (Registro Central de Tumores Cerebrales de los Estados Unidos)
CD46	Proteína reguladora del complemento
CD133	Del inglés, Prominin-1
CDK	Ciclina dependiente de quinasa
CDKN	Inhibidor de ciclina dependiente de quinasa
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DAB	Diamino-bencidina
DM-1	Del inglés, Myotonic dystrophy locus insulator

<i>DMBT1</i>	Del inglés, Deleted in Malignant Brain Tumors-1
DMEM/F12	Dulbecco Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sulfoxido
DPBS	Solución salina tamponada con fosfato
E1-E4	Unidades de transcripción temprana
E1A	Región temprana de Adenovirus
E2F	Factor de transcripción involucrado en el control del ciclo celular.
ECM	Matriz extracelular
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FBS	Suero fetal bovino
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FITC	Anticuerpo de cabra anti ratón IgG conjugado con fluoresceína
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GBM	Glioblastoma multiforme
GFP	Proteína verde fluorescente
GLI1	Familia GLI Zinc Finger 1
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GRB2	Factor de crecimiento unido al receptor de la proteína 2
GSCS	Células madre de Glioblastoma
hASH1	Del inglés, Mammalian/human achaete-scute homolog 1
H-E	Hematoxilina-eosina
HRP	<i>Horseshoe</i> peroxidasa
hTERT	Telomerasa transcriptasa inversa
HYAL	Hialuronidasa
IC ₅₀	Concentración media inhibitoria máxima
ID2	DNA-binding inhibidor de la proteína ID-2
IFN- γ	Interferón gamma
IgG	Inmunoglobulina G
IHQ	Inmunohistoquímica
INK	Proteínas supresoras de tumores. Ayudan en el mantenimiento de la integridad del genoma
K	Secuencia kozak

IL-6	Interleuquina 6
Kda	Kilodalton
KKTK	Dominio KKTK (Lys-Lys-Thr-Lys)
L1-L5	Unidades de transcripción tardía
LB	Buffer de carga
LITR	Secuencia invertida repetida izquierda de adenovirus
LOH	Pérdida de heterocigosidad
MAPK	Via de señalización de las MAP quinasas
MB	Meduloblastoma
MCH I	Complejo mayor de histocompatibilidad
MDM2	Del inglés, murine doble minute 2
MGMT	Metil guanina metil transferasa
MMR	Del inglés, Mismatch repair mechanism
MOI	Del inglés, Multiplicity of infection
MOCK	Control sin infección
mTOR	Del inglés, Mechanistic target of rapamycin
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazolio Bromuro
<i>MYCC</i>	Oncogen
NOTCH	Vía de señalización de Notch
O/N	Del inglés, Over Night (toda la noche)
OMS	Organización Mundial de la Salud
p21	Proteína inhibidora de ciclina dependiente de quinasa.
p53	Proteína supresora de tumores. Gen <i>p53</i> o <i>TP53</i> .
pA	Secuencia de poliadenilación.
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PBS++	Solución salina tamponada con fosfato Ca ²⁺
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGFRA	Del inglés, Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha
PFU	Del inglés, Plaque-forming unit
<i>PTEN</i>	Del inglés, Phosphatase and tensin homolog
pH	Medida de acidez o alcalinidad de una disolución
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
PH20	Hialuronidasa PH20

PNETs	Tumores Neuroectodérmicos Primitivos
pRB	Proteína del retinoblastoma
<i>PTCH1</i>	Gen que codifica la proteína homóloga 1
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RB	Vía de señalización del Retinoblastoma
RGD	Motivo tripéptido Arg-Gly-Asp
RGDK	Modificación (unión de RGD y KKTK). Véase anexo I
RITR	Secuencia invertida repetida derecha de adenovirus
r.c.f	Del inglés, Relative centrifugal force
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RTK	Receptor de tirosinas quinasas
RT-PCR	PCR a tiempo real
SA	Aceptor de unión
SDS	Dodecilsulfato sódico
SHH	Vía de señalización de Sonic Hedgehog
SNC	Sistema Nervioso Central
Sp1	Sitio de unión en el nucleótido 415
T ^a	Temperatura
TCDI ₅₀	Del inglés, Tissue culture infection dose replication assay.
TERT	Telomerasa transcriptasa inversa
TMZ	Temozolamida
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
T-PBS	Tween-PBS
U	Unidad
WB	Del inglés, <i>Western blot</i>
WNT	Vía de señalización de WNT

Índice

INTRODUCCIÓN.....	27
1. TUMORES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC).....	29
1.1. Clasificación morfológica de los tumores del SNC	29
1.2. Los gliomas	30
1.3. Los tumores embrionarios.....	32
2. PNETs.....	33
2.1. Características generales de los PNETs	33
2.2. Características anatomopatológicas de los PNETs	33
2.3. Genética molecular y citogenética de los PNETs	35
2.4. Alteraciones de las vías de señalización de los PNETs	36
2.4.1. Vía de señalización del gen RB.....	37
2.5. Tratamiento de los PNETs	40
3. GLIOBLASTOMA MULTIFORME (GBM)	40
3.1. Características generales del GBM	40
3.2. Epidemiología del GBM	42
3.3. Características anatomopatológicas del GBM	43
3.4. Marcadores y alteraciones moleculares involucradas en la patogénesis del GBM	43
3.4.1. Vía de señalización del gen RB.....	46
3.5. Tratamiento del GBM	47
4. ADENOVIRUS	51
4.1. Introducción	51

4.2. Adenovirus Oncolíticos.....	56
4.2.1. Delta-24-RGD	56
4.2.2. VCN-01	58
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	65
MATERIALES Y MÉTODOS.....	69
1. MATERIALES.....	71
1.1. Líneas celulares.....	71
1.2. Adenovirus	73
2. MÉTODOS.....	74
2.1. Amplificación viral	74
2.2. Ensayos de viabilidad celular.....	79
2.3. Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario	81
2.4. RT- PCR cuantitativa	81
2.5. Análisis mediante citometría de flujo de los receptores Integrina $\alpha\beta 3$, Integrina $\alpha\beta 5$ y CAR.	82
2.6. Análisis mediante citometría de flujo de la infectividad a través del dominio RGD del virus.....	83
2.7. Análisis de proteínas mediante <i>Western blot</i>	83
2.8. Ensayos de replicación viral.....	85
2.9. Estudios con animales	87
2.10. Tinción hematoxilina-eosina de los cerebros	92
2.11. Análisis inmunohistoquímico.....	96

2.12. Análisis estadístico	98
RESULTADOS	99
1. PNETs.....	101
1.1. Análisis de la expresión de los receptores celulares para el adenovirus (CAR e integrinas $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$) en las células establecidas de PNETs.	101
1.2. Delta-24-RGD y VCN-01 se replican eficientemente en líneas celulares establecidas de PNETs <i>in vitro</i>	102
1.3. El adenovirus VCN-01 ejerce un potente efecto antitumoral en líneas celulares establecidas de PNETs.	106
1.4. El tratamiento con VCN-01 resultó en un efecto antitumoral significativo en dos modelos de PNETs <i>in vivo</i>	107
2. GLIOBLASTOMA MULTIFORME	121
2.1. El adenovirus VCN-01 ejerce un potente efecto antitumoral en líneas celulares establecidas y células madre tumorales de GBM <i>in vitro</i>	121
2.2. VCN-01 se replica eficientemente en líneas celulares establecidas y células madre tumorales de GBM <i>in vitro</i>	125
2.3. El tratamiento con VCN-01 resultó en un efecto antitumoral significativo en dos modelos de GBM <i>in vivo</i>	129
DISCUSIÓN.....	137
1. Los PNETs y los GBMs frente a Delta-24-RGD y VCN-01.....	146
2. La expresión de CAR, Integrinas $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ y la infectividad	146
3. La viabilidad celular	147
4. La replicación viral.....	147
5. El efecto antitumoral	149

Índice

CONCLUSIONES.....	151
BIBLIOGRAFÍA.....	155
ANEXOS.....	175

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. TUMORES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC)

1.1. Clasificación morfológica de los tumores del SNC

Las descripciones microscópicas de los tumores cerebrales comenzaron a principios del siglo XIX. En 1926 Bailey y Cushing (Bailey & Cushing, 1926) desarrollaron un esquema de clasificación que sentó las bases sobre las que todavía se apoya el diagnóstico patológico actual. Su sistema proponía que las neoplasias del SNC provenían de precursores gliales (pertenecientes a la glía, las células no neurales de soporte en el SNC) o neurales (pertenecientes a las células neuronales, las unidades funcionales primarias del sistema nervioso) bloqueados en estadios de desarrollo concretos, y de ese modelo surgieron conceptos como histogénesis (origen tisular o tumoral en referencia a su desarrollo y formación) y célula de origen. Mejoras posteriores, realizadas principalmente por Kernohan (Kernohan & Mabon, 1949) y Ringertz (Ringertz, 1950) llevaron a la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), que se formalizó por primera vez en 1979 (Zülch, 1979) y fue renovada en 2007 (Louis *et al.*, 2007).

Actualmente, se ha publicado la nueva clasificación de los tumores del Sistema Nervioso Central (Louis *et al.*, 2016), sin embargo, en este trabajo hacemos referencia a la clasificación publicada en 2007 (Louis *et al.*, 2007) ya que cuando comenzamos este estudio todavía no se había publicado esta última clasificación.

En relación a la clasificación de 2007, la agrupación morfológica de los tumores cerebrales respecto a su presunta histogénesis, la OMS destaca por su gradación las clases tumorales individuales (I, II, III, IV) que reflejan el comportamiento biológico de estos tumores. Los grados más altos (grados III y IV) suelen seguir un desarrollo clínico más agresivo, en ausencia de tratamiento, que sus homólogos de menos grado (I y II).

El **grado I de la OMS** incluye lesiones de bajo potencial proliferativo y posibilidad de curación tras resección quirúrgica.

El **grado II de la OMS** incluye lesiones benignas que, por lo general, son infiltrantes y de baja actividad mitótica, pero que recidivan con mayor frecuencia que los tumores de

grado I después de la administración de tratamiento local. Algunos tipos de tumores tienden a progresar a grados más altos de malignidad.

El **grado III de la OMS** incluye lesiones de histología de neoplasia maligna, incluso núcleos atípicos y aumento de la actividad mitótica. Estas lesiones tienen histología anaplásica y capacidad de infiltración. Habitualmente, se tratan con terapia adyuvante.

El **grado IV de la OMS** incluye lesiones que presentan actividad mitótica que las hace propensas a la necrosis y proliferación vascular, en general, se relacionan con evolución pre-quirúrgica y post-quirúrgica y desenlaces mortales. Las lesiones habitualmente se tratan con terapia adyuvante.

1.2. Los gliomas

La mayoría de los gliomas (supuestamente derivados bien de glía madura o bien de precursores menos diferenciados) se infiltran de forma difusa en el tejido cerebral circundante (Figura 1). Estos tumores conforman un amplio grupo diagnóstico, que la OMS divide en categorías astrocíticas, oligodendrogiales y mixtas (oligoastrocíticas) (Louis *et al.*, 2007), dando lugar a la siguiente clasificación:

1. Tumores astrocíticos
 - Astrocitoma difuso (grado II)
 - Astrocitoma anaplásico (grado III)
 - Glioblastoma multiforme (GBM, grado IV)
2. Oligodendrogiales
 - Oligodendroglioma
3. Gliomas mixtos
 - Oligoastrocitoma
4. Tumores ependimarios
 - Ependimoma
5. Tumores neuronales y mixtos
 - Gangliocitoma

6. Tumores gliales/neuronales
 - Tumor neuroepitelial disembrionario
 - Ganglioglioma
7. Tumores embrionarios
 - Meduloepitelioma
 - Ependimoblastoma
 - Neuroblastoma
8. Tumores neuroectodérmicos primitivos
 - Meduloblastoma (MB)

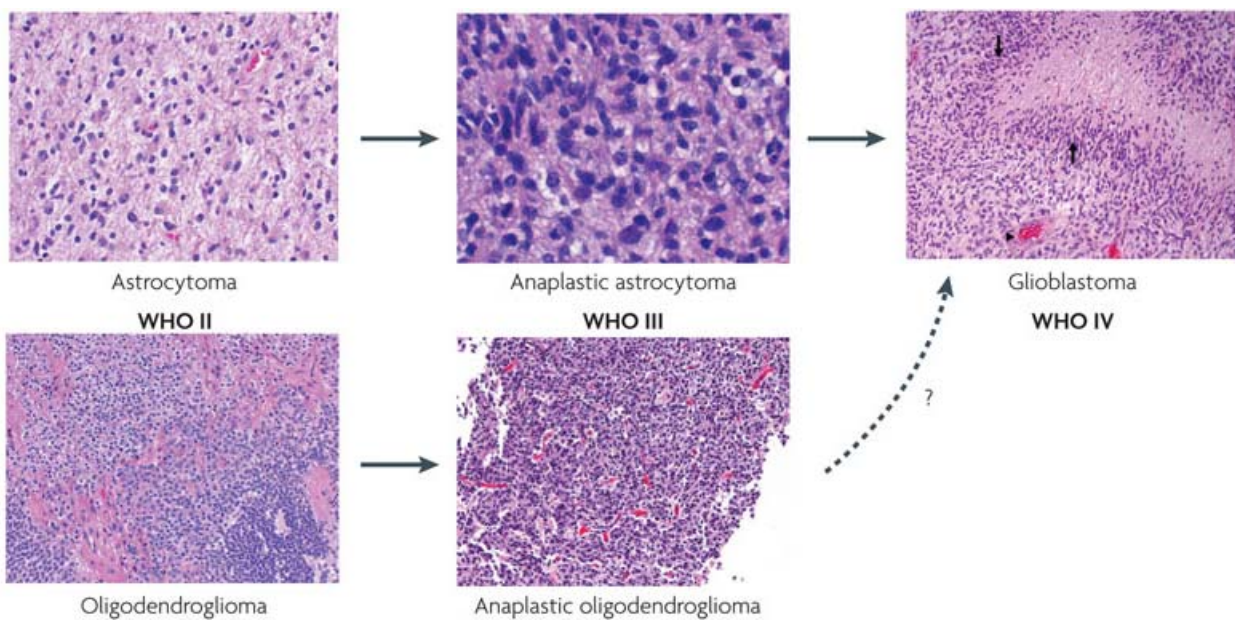


Figura 1. Morfología de los gliomas astrocíticos y oligodendrogiales. Micrografías representativas de cada clase tumoral. Se indican las características histológicas distintivas del glioma, como la proliferación microvascular (punta de flecha negra) y la necrosis en pseudoempalizada (flecha negra) (Huse & Holland, 2010).

La presencia de características histológicas como la atipia nuclear, el aumento de proliferación, la proliferación microvascular y la necrosis, dan como resultado una clasificación de alto grado, correspondiente a astrocitoma anaplásico o GBM.

1.3. Los tumores embrionarios

Los tumores embrionarios del SNC constituyen un grupo heterogéneo de tumores grado IV de la OMS que proceden de células muy indiferenciadas y que incluyen al meduloblastoma (MB), tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales (PNETs), meduloepitelioma, ependimoblastoma y tumor teratoide/rabdoide atípico (ATRT) (Louis *et al.*, 2007). Tienen en común su comportamiento agresivo y su capacidad de diseminación en el sistema nervioso, o incluso a otros órganos del cuerpo. A pesar de que su apariencia es a menudo similar bajo el microscopio, sus alteraciones genéticas son distintas y por lo tanto hoy en día se consideran entidades diferenciadas. Tanto los PNETs de los hemisferios cerebrales como los MB del cerebelo son más frecuentes en niños, aunque también pueden aparecer en adultos. El tumor teratoide/rabdoide atípico (ATRT) es un tumor embrionario que aparece habitualmente en niños menores de 3 años. El 65% se diagnostican en niños menores de 5 años. Corresponde al 2,5 - 6 % de todos los tumores cerebrales en niños. Raramente, pueden presentarse también en adultos y no existe predilección de géneros afectando por igual tanto al sexo masculino como al femenino.

El MB es el tumor cerebral maligno más frecuente en la infancia; sin embargo representa sólo el 1% de los tumores primarios cerebrales en adultos. El 70% de los MB ocurren en pacientes menores de 16 años. En la edad adulta aparece también típicamente en las edades más jóvenes (el 80% se diagnostican entre los 21 y los 40 años de edad). A pesar de que clásicamente se ha considerado a los MB como una variedad de PNETs de aparición infratentorial, existen evidencias de que MB y PNETs supratentoriales son entidades diferentes desde el punto de vista genético-molecular.

Al igual que los MB, los PNETs supratentoriales aparecen predominantemente en niños y adolescentes, pero son mucho menos frecuentes (representan aproximadamente el 3% de los tumores cerebrales primarios en este rango de edad). No existe consenso sobre su frecuencia de aparición en adultos, debido a su baja incidencia.

El meduloepitelioma es un tumor infrecuente que suele afectar a niños entre los 6 meses y los 5 años de edad, siendo el 50% de los diagnosticados antes de los 2 años de edad.

El ependimoblastoma es un tumor infrecuente que aparece en neonatos y niños pequeños.

El 65% los tumores neuroectodérmico primitivos se diagnostican en niños menores de 5 años de edad. Corresponde al 2,5 - 6 % de todos los tumores cerebrales en niños. Raramente, se presentan también en adultos.

Por otro lado, los tumores PNETs periféricos también se producen predominantemente en tejidos blandos y huesos de los niños y adolescentes, principalmente en las extremidades, regiones paravertebrales y retroperitoneales.

Sin embargo, a pesar de la gran clasificación de los tumores del sistema nervioso central, en este proyecto sólo hemos trabajado con los PNETs y el GBM. Por ello, son los que se explican, con más detalle, a continuación.

2. PNETs

2.1. Características generales de los PNETs

Este término PNET, se refiere a un grupo heterogéneo de tumores embrionarios que se dan predominantemente en niños y adolescentes y clínicamente muestran un comportamiento agresivo. La incidencia es aproximadamente un décimo de la frecuencia del MB (Jakacki *et al.*, 1995). Los PNETs surgen comúnmente en el cerebro, y menos frecuente en otros lugares como la profunda zona paraventricular o zonas medias como el diencéfalo o los ganglios basales. Estos tumores pueden estar fenotípicamente mal diferenciados, o pueden mostrar una diferenciación neural muy divergente, líneas astrocíticas, endimarias, musculares o melanocíticas (Louis, *et al.*, 2007). Estos tumores son considerados generalmente tumores pediátricos, raramente son descritos en adultos y representan diferentes enfermedades. En la clasificación de la OMS (Louis *et al.*, 2007), estos tumores son denominados como PNETs supratentoriales.

2.2. Características anatomopatológicas de los PNETs

Como no existen marcadores específicos, estas lesiones siguen siendo diagnosticadas según la localización supratentorial y las características histológicas de tumores

neuroepiteliales predominantemente indiferenciados con áreas de diferenciación divergente. La subclasificación de los PNETs se basa en su diferenciación histológica.

- Neuroblastoma

Éste tipo de PNET es una forma de cáncer infantil que se forma en el tejido nervioso. Generalmente, se suele localizar con mayor frecuencia en las glándulas suprarrenales, también puede desarrollarse en el cuello, o la médula espinal.

- Ganglioneuroblastoma

Reciben este nombre los neuroblastomas en los que también las células de los ganglios son tumorales.

- Meduloepitelioma

Son tumores que muestran características de la formación del tubo embrionario neural y ocurren en niños de entre 6 meses y 5 años. Pueden estar localizados en los compartimentos supratentorial e infratentorial.

- Ependimoblastoma

Estos tumores contienen rosetas ependimoblasticas. Son raros y crecen rápidamente. Ocurren preferentemente en neonatos y niños de menos de 5 años. Están normalmente localizados en el compartimento supratentorial.

Los pacientes con PNETs presentan diferentes síntomas dependiendo de la localización del tumor y el tamaño. Las parestias y las convulsiones ocurren cuando el tumor está en el córtex cerebral, elevando la presión intracraneal ocasionando dolor de cabeza, letargo o vómitos. Por otro lado, los tumores supraselares pueden obstruir el líquido cerebroespinal provocando déficits visuales y endocrinopatías.

Las características histológicas primitivas de estos tumores indican que los PNETs proceden de la transformación de las células germinales de la matriz periventricular (Trojanowski *et al.*, 1992) debido a la frecuente presencia de esos tumores en zonas

profundas periventriculares. Otros estudios indican que las células subependimales del diencéfalo pueden ser el origen de los PNETs.

2.3. Genética molecular y citogenética de los PNETs

No hay muchos estudios genéticos moleculares sobre los PNETs sin embargo, los estudios realizados sugieren que los PNETs tienden a ser similares a las variantes más agresivas de MB. Esto es muy interesante para determinar si las variantes agresivas de MB comparten características moleculares con PNETs y cuáles son los marcadores moleculares que distinguen ambos tipos de tumores.

Los PNETs frecuentemente muestran cariotipos complejos con un alto nivel de amplificación génica. Las alteraciones citogenéticas incluyen deleciones o translocaciones involucrando al cromosoma 10q22-26 (30% de los casos) y al cromosoma 6q21-25 (20% de los casos.) Algunos pacientes muestran translocación en el cromosoma 6q25 y el cromosoma 13q14, que implican al locus del gen RB1 en el cromosoma 13q14 y oncogen o el gen supresor de tumores del cromosoma 6q21-25.

Además, los PNETs muestran una mayor frecuencia de pérdida que de ganancias de cromosomas. La pérdida de material genético implica a los cromosomas 4q2 (50% de los casos) y 10q (25% de los casos) e indica que los genes supresores de tumores tienen un papel muy importante en la formación de estos tumores (BTRC, PTEN O DMBT1) (Bayani *et al.*, 2000). Otras pérdidas menos frecuentes afectan a los cromosomas 3q21, 9q2 y 19q2.

Regiones con un elevado número de copias de ganancias o amplificaciones en los PNETs incluyen los cromosomas 2q24 (oncogén MYCN); 9q (Bayani *et al.*, 2000); 4q12q13 (Bayani *et al.*, 2000); 7p11.2-p12 y 7q21.3-q22 (Nicholson *et al.*, 1999); 12q21, 20q, 1q y 6p y el locus de hTERT en el cromosoma 5p15 (Fan *et al.*, 2003). Puede darse una ganancia de 17q o del cromosoma 17 completo en estos tumores.

2.4. Alteraciones de las vías de señalización de los PNETs

SHH, NOTCH, y menos frecuentemente WNT son las vías de señalización que controlan el desarrollo normal del cerebro y que también están implicadas en el desarrollo de los PNETs (Figura 2).

- Vía de señalización SHH: el papel de esta vía de señalización está bien definida y controla el desarrollo del crecimiento de la zona dorsal y la corteza cortical del cerebro, contribuyendo a la formación de los PNETs. Las alteraciones más comunes incluyen el aumento de la expresión de los factores de transcripción GLI1, SMO y PTCH1 (Dahmane *et al.*, 2001).

Además, la mayoría de los PNETs expresan MYCN, lo que hace que se desregule disminuyendo la expresión de la vía de señalización SHH (Moriuchi *et al.*, 1996). Las mutaciones sin sentido que incluye al locus de PTCH1 en el cromosoma 9q22.3 también han sido relacionadas con la formación de estos tumores (Wolter *et al.*, 1997).

- Vía de señalización NOTCH: está activa en los tumores PNETs. La expresión de hASH1 también está elevada en algunos PNETs. La expresión de Notch1 y Notch2 en los PNETs es elevada, sobre todo la de Notch2.
- Vía de señalización de WNT: Las aberraciones en esta vía de señalización casi no han sido investigadas en este tipo de tumor. Sólo la mutación de la β -catenina ha sido identificada en estudios sobre los PNETs. Esta mutación está correlacionada con la acumulación de β -catenina en el núcleo y la activación de la vía de señalización Wnt. Las células de PNET muestran un aumento de la expresión de MYCC y MYCN y una disminución de las dianas de β -catenina (Kees *et al.*, 1994), sugiriendo un importante papel de la vía de señalización Wnt para el desarrollo de los PNETs.

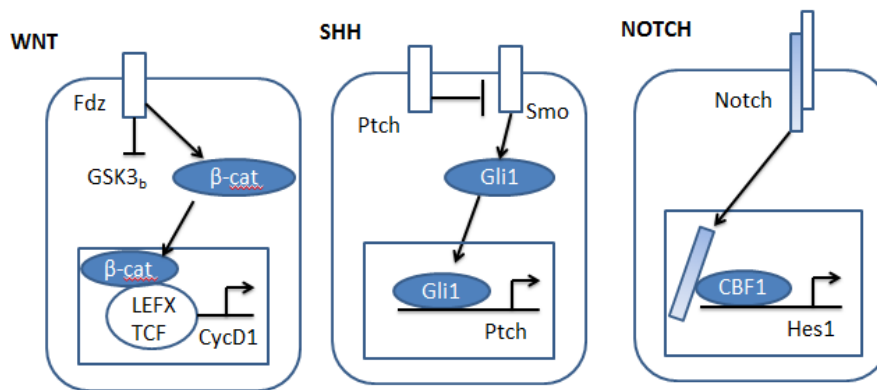


Figura 2. Representación gráfica de tres vías comunes de señalización. De izquierda a derecha: WNT, SHH, NOTCH.

Además, también se ha demostrado que la alteración de la vía de señalización del retinoblastoma está relacionada con los tumores retinoblastoma trilateral (BRT) (Schwartz *et al.*, 1990).

El retinoblastoma trilateral (BRT) es un tipo de tumor neuroectodérmico primitivo maligno que ocurre en los pacientes con retinoblastoma hereditario unilateral o bilateral. En la mayoría de los casos de retinoblastoma trilateral se presenta como pineoblastoma (pineal BRT). Es una neoplasia poco frecuente que ocurre en los pacientes con mutaciones de la línea germinal. Si bien esto es más común en los casos bilaterales, algunos pacientes con retinoblastoma unilateral que llevan mutaciones en la línea germinal también están a riesgo de desarrollar este tumor (Ibarra & O' Brien, 2000).

2.4.1. Vía de señalización del gen RB

Se ha estudiado que la perturbación de la función de la proteína retinoblastoma (RB) se encuentra en la mayoría de los tumores humanos. ID2 se une naturalmente a la proteína RB ya que es reclutado por las oncoproteínas Myc. La sobreexpresión de ID2 media la transformación celular y es necesaria para mantener el comportamiento maligno de las células de neuroblastoma (Lasorella *et al.*, 2002).

La vía RB consta de cinco familias de proteínas (Figura 3): CDKN, ciclinas tipo D, ciclinas dependientes de ciclinas (CDK4, CDK6), familia de proteínas RB (RB, p107, p130), y la familia de factores de transcripción E2F.

Esta vía desempeña un papel central en la regulación de la proliferación celular y varios componentes de esta vía *p16INK4a*, ciclina D1, y RB, se alteran con frecuencia en células tumorales, incluyendo la eliminación y/o el silenciamiento de *p16INK4a*, la amplificación de la ciclina D1, y la mutación bialélica de RB1. Así, los componentes de esta vía son objetivos en la terapia del cáncer.

Las interacciones funcionales entre las cinco familias de proteínas en esta vía están bien establecidas. La familia de proteínas INK4: *p16INK4a*, *p15INK4b*, *p18INK4c*, y *p19INK4d* son proteínas termoestables pequeñas que contienen el dominio AKN (repetición anquirina). Cada una de las proteínas INK4 puede unirse e inhibir la actividad de CDK4 y CDK6. Las CDK4/6 son quinasas dependientes de ciclinas D. Cada una de las ciclinas se pueden asociar con CDK4 o CDK6 para formar el complejo quinasa activo. Las proteínas INK4 compiten con las ciclinas D para CDK4/6 y evitar la formación del complejo quinasa activo. Durante la proliferación, el complejo de CDK4/6 se activa y la célula entra en el ciclo celular.

Los principales objetivos celulares del complejo son la familia de proteínas RB que contienen múltiples bolsillos de unión a fosfatos para regular los factores de transcripción de la cromatina.

La familia de factores de transcripción E2F son regulados por las proteínas RB para inhibir la transcripción. CDK4 y CDK6 interrumpen la interacción E2F-RB, provocando la activación de la expresión de genes regulados por E2F. E2F se une al ADN y regula los promotores de múltiples genes implicados en la progresión del ciclo celular y, por lo tanto, las alteraciones en la vía RB pueden afectar la respuesta de las células tumorales a agentes citotóxicos.

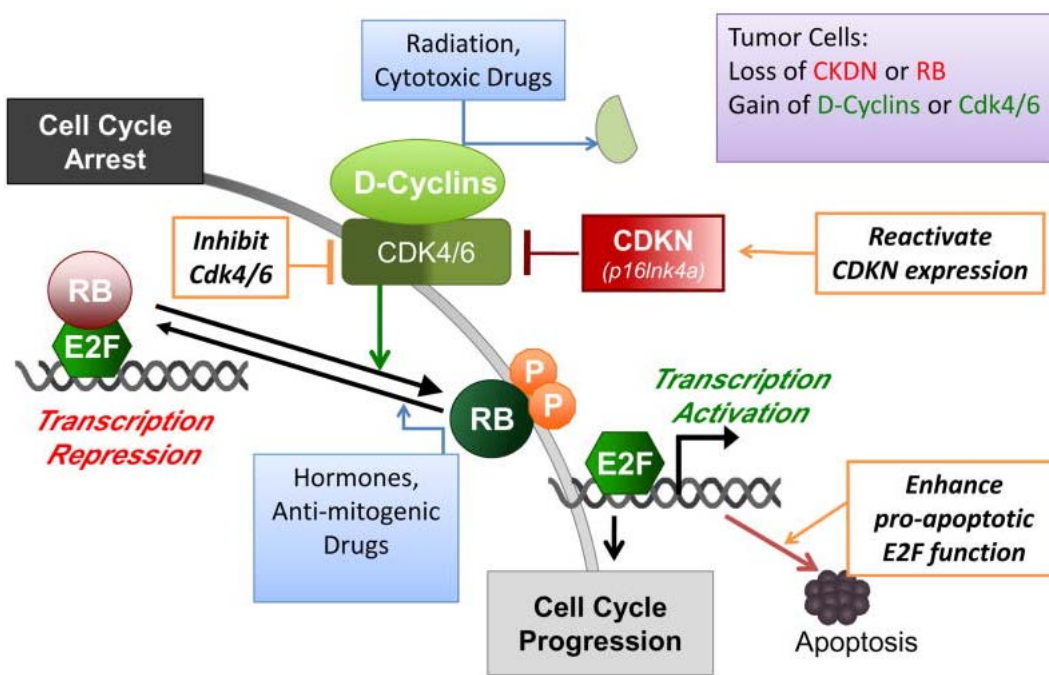


Figura 3. Vía de señalización del retinoblastoma (RB) en el cáncer. Los componentes de la vía de señalización de RB, E2F, ciclinas de tipo D, CDK4/6, p16Ink4a (CDKN2A), y sus interacciones funcionales, se representan en el diagrama. Las alteraciones genéticas y epigenéticas en los principales cánceres humanos, se resumen en el cuadro de color morado en la esquina superior derecha del diagrama. El estado de la vía RB afecta a las respuestas de células tumorales a los fármacos de radiación y genotóxicos, que causan la detención del ciclo celular a través de la degradación de la ciclina D1 y la consecuente desfosforilación de RB. El estado de la vía RB también afecta a las respuestas de células tumorales a la hormona y otras estrategias terapéuticas que bloquean la señalización. Si la vía RB se desregula provoca que E2F el cual estimula la expresión del gen para promover la transición G1/S y la apoptosis. Muchas estrategias terapéuticas que se dirigen directamente a los defectos de la vía RB y representan en el diagrama en cajas de color naranja, y éstos incluyen la reactivación de p16Ink4a en los casos en que se silencia el gen pero no está mutado, la inhibición de la actividad quinasa de CDK4/6, y la mejora de la apoptosis dependiente de E2F. Figura tomada de Targeting the RB-pathway in Cancer Therapy (Knudsen & Wang, 2010).

En esta vía, las proteínas INK4 y RB funcionan como supresores tumorales, mientras que las ciclinas D, las CDK4/6, y el factor de transcripción E2F promueven la proliferación de la célula tumoral.

Las alteraciones del gen *p16INK4* en el neuroblastoma son muy raras. Como la expresión de *p16INK4* está estrechamente controlada en un bucle de retroalimentación con RB, Diccianni *et al*, investigaron la posibilidad de que los cambios en la expresión de *p16INK4* estuviera relacionada con la vía de regulación G1. Vieron que dos líneas celulares y una muestra primaria expresaban altamente *p16INK4*, y por tanto, CDK4 también estaba amplificado. El gen de la ciclina D2 se expresaba con poca frecuencia en las líneas de células de neuroblastoma y no se correlacionaba con la expresión de *p16INK4*. Se detectaron pequeñas variaciones en la expresión de CDK6, ciclinas D1,

D3 y E; pero no se observaron E2F1 y E2F2 en las líneas celulares. Todas las líneas celulares contenían la proteína RB con diversos grados de fosforilación, que no guardaba correlación con la expresión de *p16INK4*. En general, las alteraciones de la vía G1 en el neuroblastoma incluyen la expresión de p16 relativamente frecuente y amplificación CDK4 poco frecuentes y la expresión de ciclina D2. A pesar de una relación de retroalimentación entre la expresión de *p16INK4* y la desregulación RB/G1, la expresión de *p16INK4* en las líneas celulares de neuroblastoma es independiente del gen RB y el estado de fosforilación y, a diferencia de otras líneas celulares en donde la expresión de p16 conduce a la fase S, líneas celulares de neuroblastoma en fase G1 proliferan con niveles elevados de *p16INK4* (Diccianni *et al.*, 1999).

2.5. Tratamiento de los PNETs

La presencia de metástasis, el tamaño del tumor y la edad del diagnóstico son importantes para el tratamiento de estos tumores. Debido a sus características clínicas agresivas, los PNETs tradicionalmente han recibido terapias diseñadas para la metástasis, lo que incluye quimioterapia y altas dosis de radiación en la cabeza y la médula espinal. Actualmente, la supervivencia media de los PNETs no es elevada, con 3 años de supervivencia sin progresión del 50% de los PNETs (Hong *et al.*, 2004). Estas observaciones marcan la necesidad de estudiar más profundamente la tumorigénesis de los PNETs para diseñar terapias más exitosas.

3. GLIOBLASTOMA MULTIFORME (GBM)

El glioblastoma multiforme es un tipo de tumor maligno que se localiza en el cerebro.

3.1. Características generales del GBM

El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor cerebral primario maligno más frecuente según el registro de tumores cerebrales de EE.UU. (Ostrom *et al.*, 2013), con

una mediana de supervivencia global de alrededor de 12-15 meses (Daumas-Duport, *et al.*, 1988).

Constituye el 15% de los tumores intracraneales, entre el 60-75 % de los tumores astrocitarios y el 45% de los tumores malignos primarios del sistema nervioso central (SNC) con una incidencia aproximada de 2-4 casos nuevos por cada 100.000 habitantes/año (Ostrom *et al.*, 2014). El GBM es un tumor que puede aparecer en cualquier momento de la vida, la incidencia aumenta con la edad y es máxima entre los 55 y 75 años.

En la mayoría de los casos surge de novo (glioblastoma primario), pero también puede evolucionar a partir de neoplasias astrocíticas de grado bajo (glioblastoma secundario) (Behin *et al.*, 2003). El término “multiforme” hace referencia a la naturaleza heterogénea de este tipo de tumor y a su variada composición histológica (Burger & Kleihues, 1989). Esta heterogeneidad celular incluye tipos celulares diferenciados con morfología estrellada y expresión de marcadores como GFAP y S100, así como otros tipos celulares indiferenciados, más pequeños y redondeados, mezclados con elementos del estroma tales como proliferación celular microvascular, astrocitos reactivos, microglía y otros infiltrados del sistema inmune (Hadjipanayis & Van Meir, 2009). Una de las características más importantes del GBM es su patrón de distribución difusa por el tejido, que resulta en una extensa diseminación de las células tumorales dentro del cerebro, lo que dificulta su resección quirúrgica completa (Holland, 2000).

En concreto, puede presentarse en cualquier localización del SNC, aunque aparece preferente en la sustancia blanca de los hemisferios cerebrales con crecimiento y extensión hacia la matriz periventricular y hacia los tractos de sustancia blanca de mielina como el cuerpo calloso haciéndose bilateral, fórmix, comisura anterior o posterior o cápsula interna en su extensión hacia el tronco del encéfalo. El GBM puede aparecer como un tumor único o bien con varios focos a distancia.

Típicamente su presentación desde el punto de vista de la imagen es la de una o varias lesiones que muestran una zona de captación de contraste periférica en forma de anillo con una zona central hipodensa en tomografía axial computarizada (TAC) o hipointensa en resonancia magnética (RM) que se corresponde con la necrosis central. Por todo ello,

el GBM debe incluirse en el diagnóstico diferencial de cualquier lesión intracraneal que presente estas características.

La manifestación clínica en su forma de presentación queda condicionada por la localización del tumor más que por cualquier otra variable. Tumores próximos a áreas elocuentes, corticales o con infiltración de la corteza suelen generar un déficit neurológico derivado del efecto de masa local (disfasia, hemiparesia, hemianestesia, hemianopsia) o bien crisis epilépticas derivadas de la irritación de la corteza adyacente. Los tumores en áreas no elocuentes alcanzan generalmente un mayor tamaño antes de la manifestación de los síntomas derivados de un síndrome de hipertensión intracraneal: cefalea, vómitos, confusión o disminución del nivel de conciencia.

3.2. Epidemiología del GBM

La incidencia de tumores cerebrales malignos en niños y adultos ha aumentado progresivamente en los últimos 25 años (Jukich *et al.*, 2001; Deorah *et al.*, 2006; Deltour *et al.*, 2009; Pirouzman & Sadanand, 2007; Smith *et al.*, 1998; Hess *et al.*, 2004). Aunque parte de este incremento podría ser resultado de una mejora de las técnicas de neuro-imagen y el acceso a la atención médica (Schwartzbaum *et al.*, 2006), los estudios epidemiológicos y la variabilidad geográfica de los casos sugieren que la etiología de los tumores cerebrales podría estar asociada con factores ambientales y la exposición a carcinógenos. Por otra parte, las mutaciones genéticas familiares, enfermedades del sistema inmune y la radiación de alta dosis son causas conocidas de los tumores cerebrales, aunque probablemente sólo sean responsables de un bajo porcentaje de los casos (Schwartzbaum *et al.*, 2006; Wrensch *et al.*, 2002; Fisher *et al.*, 2007).

Pese a que los tumores cerebrales representan una minoría de los casos de cáncer, con una incidencia de 14,8 tumores cerebrales por cada 100.000 personas al año en Estados Unidos, y prácticamente la mitad de ellos son diagnosticados como benignos, las formas malignas de tumor cerebral presentan una perspectiva devastadora en cuanto a morbilidad y mortalidad (Buckner *et al.*, 2007). Los tumores cerebrales más malignos son los gliomas, y dentro de los gliomas, el GBM es el más común, representando el

40% de todos los tumores malignos primarios del sistema nervioso central (Miller & Perry, 2007).

3.3. Características anatomopatológicas del GBM

El GBM o astrocitoma IV de la organización mundial de la salud (OMS) se trata de un tumor heterogéneo, que siguiendo los criterios de clasificación de la OMS de 2007 (Louis *et al.*, 2007) se caracteriza por la presencia de proliferación de células gliales anaplásicas, con citoplasma eosinófilo y núcleo hipercromático sobre una matriz fibrilar, con la presencia de frecuentes figuras mitóticas. La proliferación vascular y/o la necrosis son condición necesaria para establecer el diagnóstico. Estos hallazgos se corresponden macroscópicamente, en general, con un tumor de consistencia gelatinosa, de color grisáceo y moderadamente vascularizado con un centro blanquecino avascular correspondiente a la necrosis.

Se distinguen en general 4 subtipos histológicos más allá de la histología clásica. **1)** *Glioblastoma de células pequeñas.* **2)** *Glioblastoma de células grandes*, en función del patrón celular predominante. **3)** *Gliosarcoma*, GBM con un componente de células fusiformes con avidéz e infiltración de meninges y tejido mesenquimal como el hueso. **4)** *Glioblastoma con un componente oligodendroglial.* La definición viene dada por la presencia de un componente oligodendroglial sobre la descripción clásica de la histología tipo del GBM, esto es, con la presencia por tanto de proliferación vascular y necrosis (Homma *et al.*, 2006).

3.4. Marcadores y alteraciones moleculares involucradas en la patogénesis del GBM

Existen numerosas alteraciones moleculares que se han relacionado con la biología subyacente al glioblastoma y que afectan a vías de transducción de señales que regulan la proliferación celular (Figura 4).

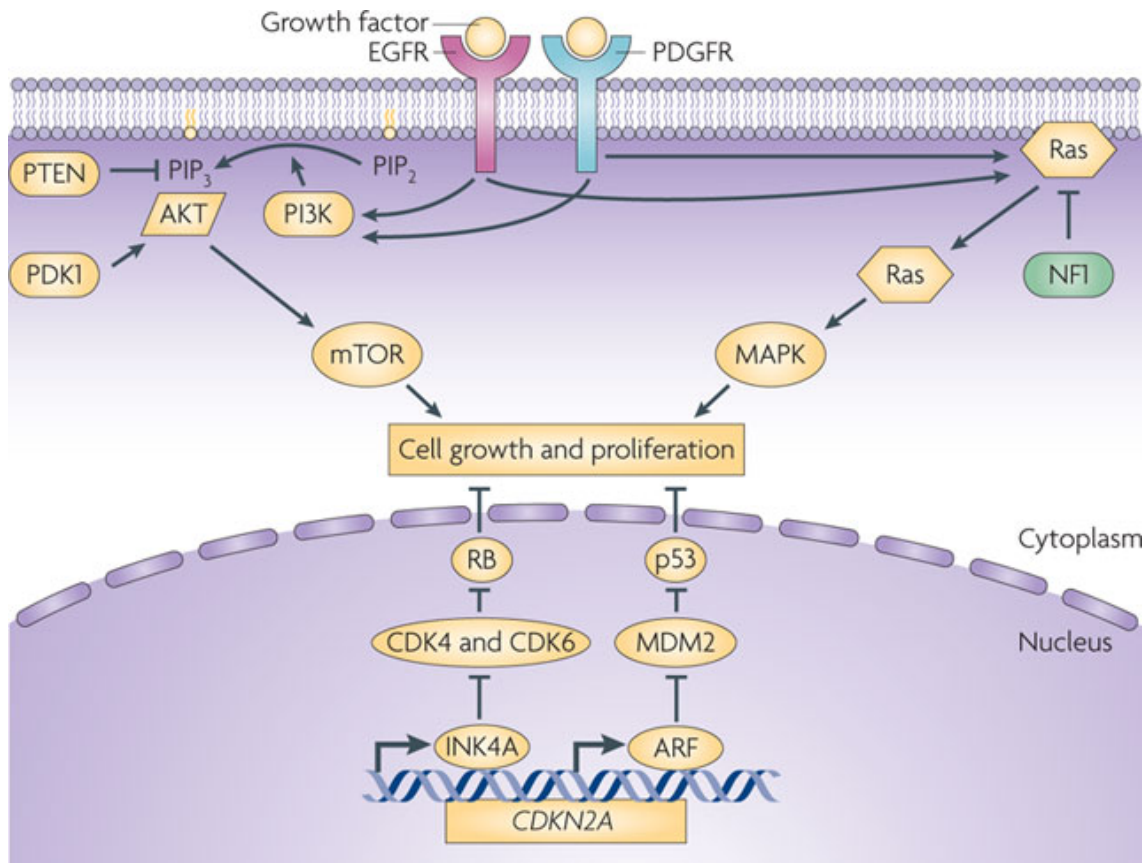


Figura 4. Esquema de las rutas moleculares más importantes en la patogénesis del glioma. Las vías de señalización PI3K-AKT-mTOR y Ras-MAPK son muy importantes en la biología de los gliomas. Las alteraciones a nivel genómico que pueden aparecer en tres proteínas que participan en las vías PI3K-AKT-mTOR y Ras-MAPK: EGFR, PDGFR y NF1, permiten caracterizar distintos subtipos de glioma (punto 2.1). También son comunes los fallos en las rutas de los supresores tumorales RB y p53 (Huse & Holland, 2010).

Resultan de especial interés las vías de señalización PI3K-AKT-mTOR y Ras-MAPK, que propagan la señal recibida por receptores tirosin-quinasa (RTKs), tales como el receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR) y el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR). Las alteraciones que provocan la activación constitutiva de estas vías tienen un papel muy importante en el desarrollo de los gliomas, así como de otros cánceres. Se han estudiado extensamente las alteraciones en el receptor de crecimiento epidérmico EGFR, ya que en estudios iniciales el GBM primario se asoció con amplificaciones génicas y mutaciones activadoras de la secuencia génica de EGFR (Libermann *et al.*, 1985; Libermann *et al.*, 1984; Wong *et al.*, 1992), siendo la más frecuente la delección variante III (vIII) que se halló en el 20-30% de GBM primarios y en el 50-60% de los casos con amplificación de EGFR (Frederick *et al.*, 2000; Sugawa *et al.*, 1990). También se ha demostrado la implicación de otros RTKs en la gliomagénesis, incluyendo el receptor del factor de crecimiento

derivado de plaquetas- α (PDGFR α), cuya señalización aumentada se observa en los tumores astrocíticos de bajo grado y oligodendrogiales, así como en un subconjunto significativo de GBMs (Di Rocco *et al.*, 1998; Westermarck *et al.*, 1995). Aunque las mutaciones activadoras en PDGFRA no son comunes (Clarke & Dirks, 2003), sí que es frecuente la co-expresión del receptor y su ligando, habitualmente PDGFB, que desencadena bucles autocrinos o paracrinos que promueven el crecimiento celular.

Además es frecuente encontrar la desregulación de otros componentes moleculares de las rutas PI3K-AKT-mTOR y Ras-MAPK en los gliomas malignos (Guha *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2004). De entre estas alteraciones, la más común es la pérdida funcional del supresor tumoral PTEN (Li *et al.*, 1997), un regulador negativo primario de la señalización PI3K-AKT-mTor (Cairncross *et al.*, 1998; James *et al.*, 1988). Se ha demostrado que la pérdida de PTEN facilita la formación de gliomas (Dai *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2005; Kwon *et al.*, 2008). Varios modelos murinos han reforzado el papel central de otras proteínas implicadas en la transducción de señales de los receptores RTK en la patogénesis del glioma maligno, tanto si la señalización está alterada a nivel del propio RTK (Dai *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2005; Ding *et al.*, 2003; Shih *et al.*, 2004; Uhrbom *et al.*, 2002; Uhrbom *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2009) o de sus proteínas efectoras (como KRAS y/o AKT) (Ding *et al.*, 2003; Ding *et al.*, 2001; Holland *et al.*, 2000). Por ejemplo, se ha demostrado que deleciones del supresor tumoral asociado a la neurofibromatosis tipo 1, neurofibromina 1 (NF1), un regulador negativo de la señalización RAS, son capaces de inducir la gliomagénesis en ratones (Kwon *et al.*, 2008; Reilly *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2005).

Otros supresores tumorales también se encuentran alterados en la gliomagénesis, particularmente componentes de las rutas P53 y retinoblastoma (RB). Las mutaciones en el gen TP53 se relacionaron por primera vez con la gliomagénesis hace 20 años, debido al aumento de desarrollo de gliomas (astrocitomas en la mayoría de los casos) en pacientes con síndrome de Li-Fraumeni, un raro síndrome hereditario causado por mutaciones germinales en TP53 (Malkin *et al.*, 1990; Srivastava *et al.*, 1990). Investigaciones posteriores descubrieron que las mutaciones TP53 eran una característica frecuente en los tumores astrocíticos esporádicos de grado bajo y glioblastomas secundarios (Louis, 1994). Asimismo se ha demostrado que la ruta supresora tumoral de RB se encuentra alterada en un 78% de GBM primarios, bien por mutaciones inactivadoras del propio gen RB1 o por amplificaciones de sus reguladores

negativos CDK4 o, menos habitualmente, CDK6 (Costello *et al.*, 1997; Henson *et al.*, 1994; Reifenberger *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 2001). De forma análoga, se ha descrito la amplificación de los antagonistas de p53, MDM2 y MDM4 en distintos subconjuntos de GBMs con TP53 intacto, así como mutaciones inactivadoras y/o deleciones en el locus de CDKN2A que codifica para dos proteínas, INK4a y ARF, que son regulares positivos de RB y p53, respectivamente. También se han identificado recientemente, mediante análisis de la secuencia del genoma completo, polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) que suponen factores de riesgo para la gliomagénesis en CDKN2A y en el gen adyacente CDKN2B (Shete *et al.*, 2009). Estos estudios también han relacionado SNPs en otros genes con una mayor incidencia de gliomas, como por ejemplo en el gen de la helicasa 1 reguladora de la elongación de los telómeros (RTEL1) y en el de la retrotranscriptasa telomerasa (TERT).

Diversos modelos murinos han proporcionado más evidencias respecto a la importancia de las alteraciones de p53 y RB en la gliomagénesis, demostrando que la pérdida de cualquiera de estos supresores tumorales puede iniciar directamente la formación de glioma, disminuir la latencia libre de enfermedad y/o aumentar el grado tumoral, en varios contextos experimentales (Dai *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2005; Reilly *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2005; Weiss *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2008).

3.4.1. Vía de señalización del gen RB

Recientemente, se ha demostrado que la vía RB está alterada en el 78% de los glioblastomas primarios. Estas alteraciones en la vía, incluyen la deleción homocigótica y la mutación de CDKN2A (p16INK4a), la mutación o deleción de RB1 (RB) y la deleción homocigótica de CDKN2B (p15INK4b) y CDKN2C (p18INK4C). Por otro lado, CDK4, CDK6, y CCND2 (ciclina D2) sufren amplificación génica en un 18% de GBMs. La proteína RB1 controla la progresión a través de G1 a la fase S del ciclo celular. El complejo CDK4 y CDK6 fosforila la proteína RB1, la determinación de la liberación del factor de transcripción E2F que activa los genes implicados en la transición G1-S.

3.5. Tratamiento del GBM

Aunque la investigación clínica ha sido muy activa para encontrar mejores métodos de tratamiento para el GBM durante los últimos años, el pronóstico del GBM permanece extremadamente pobre. Son varios los factores que complican el pronóstico. Ante todo, el cerebro es un órgano sensible y complejo, susceptible a daños causados por cirugía y quimioterapia. Por otro lado, las células tumorales GBM muestran una alta resistencia a la quimioterapia y otras terapias convencionales. La barrera hematoencefálica limita las posibilidades de tratamiento, ya que muchos medicamentos no pueden atravesarla y actuar directamente en el tumor (Lawson *et al.*, 2007).

La terapia común para los pacientes con GBM es la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia.

La naturaleza extremadamente infiltrante del GBM hace que la extirpación quirúrgica completa sea imposible. Para ello, se ha avanzado en un tipo de cirugía que permite destacar toda área tumoral, incluso las infiltrantes y lesiones dispersas. El equipo de Díez-Valle y cols (Valle *et al.*, 2012) ha utilizado un método novedoso acerca de la resección del tumor. El método consiste en cirugía guiada por fluorescencia; utilizaron un microscopio Zeiss © Pentero después de la administración de Gliolan ©. La disección del tumor se lleva a cabo a lo largo de la frontera del tumor definida por fluorescencia siempre que sea posible. La cirugía guiada por fluorescencia permite identificar porciones de tumores viables e invasivos.

El tratamiento con agentes quimioterapéuticos induce daños en el ADN y da lugar a la muerte celular. Por ello, la radioterapia concurrente y el agente alquilante oral de temozolamida (TMZ) se ha convertido en el estándar de tratamiento para los pacientes con diagnóstico de GBM.

Los agentes quimioterapéuticos utilizados con más frecuencia son carmustina (BCNU) y la TMZ. Los agentes alquilantes son más activos en la fase de reposo de la célula por ello estos fármacos no son específicos del ciclo celular. Su efecto citotóxico ha sido principalmente atribuido a la metilación de la posición O6 de la guanina. La metilación del promotor del gen MGMT (O6-metil-guanina metil transferasa) posee valor predictivo positivo al tratamiento, por ello, predice una mayor supervivencia, ya que el estado de metilación de la región promotora del gen MGMT es independiente del

tratamiento recibido. Los múltiples entrecruzamientos entre guanina y citosina pueden dar lugar a roturas en el ADN que a su vez son procesadas por el sistema de reparación de genes. Los genes MMR provocan la inducción de p53 y p21 seguida de muerte celular por apoptosis y necrosis (Fischhaber *et al.*, 1999; Gerson, 2002; Denny *et al.*, 1994).

Quimioterapia y evolución en el GBM recurrente

Una vez que recidiva el GBM, las opciones terapéuticas suelen encontrarse limitadas y no existe ningún tratamiento de referencia aceptado de manera universal. Sólo es posible el mismo tratamiento explicado anteriormente.

Los factores pronósticos más importantes son la edad, el estado funcional, el uso de esteroides y el tamaño/número de lesiones que mejoran (Gorlia *et al.*, 2012, Carson *et al.*, 2007). Otros factores de relevancia pueden ser la repetición de la resección (carga tumoral) y el estado de metilación del promotor gen MGMT.

Muchos pacientes muestran un deterioro rápido en el momento de la recidiva, lo que hace que el tratamiento no sea eficaz. Algunos pacientes manifiestan recidivas que permiten una nueva resección, aunque la mayoría presentan lesiones inaccesibles a la cirugía (por ejemplo, afectación del cuerpo calloso, lesiones profundas o lesiones en regiones elocuentes). También se está trabajando con la re-irradiación, a pesar del riesgo de neurotoxicidad acumulada, y esta estrategia resulta viable en los pacientes con lesiones de tamaño limitado (Veninga *et al.*, 2001). No obstante, la eficacia de la re-irradiación en el GBM es discutible. Normalmente se recomienda el uso de quimioterapia en caso de enfermedad recurrente. Tanto las nitrosureas (especialmente lomustina) como TMZ constituyen alternativas en determinados pacientes. Los estudios sobre el retratamiento con TMZ en el momento de la recidiva indican que esta estrategia puede ser eficaz en pacientes seleccionados: especialmente tras un intervalo sin tratamiento o en presencia de metilación del promotor de MGMT (van den Bent & Taal, 2014).

Las nitrosureas se utilizan mucho en el GBM recurrente, en particular, lomustina (CCNU), aunque también fotemustina (Brandes *et al.*, 2009). Actualmente se utiliza

lomustina como fármaco de comparación en muchos ensayos aleatorizados y controlados; por ejemplo, estudio REGAL, estudio sobre enzastaurina y ensayo holandés BELOB, aunque también en el estudio en curso de la EORTC 26101 (Wick *et al.*, 2010, Batchelor *et al.*, 2013, Taal *et al.*, 2014).

Aunque el bevacizumab es un inhibidor de la angiogénesis, se utiliza con frecuencia en el GBM recurrente. Un primer estudio fase II controlado reveló una actividad limitada con bevacizumab en monoterapia, así como indicios preliminares de actividad de la combinación de bevacizumab y lomustina, aunque se está a la espera de los resultados del estudio fase III confirmatorio de la EORTC (Taal *et al.*, 2014).

En conclusión, con los tratamientos actualmente disponibles, el GBM recurrente sigue suponiendo una necesidad clínica insatisfecha y, para poder satisfacer esa necesidad, han de investigarse nuevos fármacos.

Otros estudios y avances en el tratamiento de los GBM

Algunos estudios han demostrado que la esperanza de vida media de los pacientes diagnosticados con GBM se puede extender a un promedio de 2 años, si los pacientes son tratados con agentes quimioterapéuticos (Stewart, 2002). Sin embargo, la aparición de GBM recurrente se produce a menudo y éstos tienden a ser menos sensibles a agentes quimioterapéuticos tal como demostraron Wong y su grupo señalando que sólo un 6% de tumores GBM recurrentes respondieron a la quimioterapia (Wong *et al.*, 1999).

En un estudio realizado por Jaeckle *et al.* se ha demostrado que los pacientes con GBM con altos niveles de metilación de MGMT presentaban una esperanza de vida media de 8 meses, sin embargo, pacientes con bajos niveles de metilación tenían una esperanza de vida media 4 veces mayor (Jaeckle *et al.*, 1998).

Por otro lado, la pérdida de la proteína p53, punto de control del ciclo celular, se ha descrito como otro mecanismo común de resistencia del GBM (Bocangel *et al.*, 2002). Deleciones en los inhibidores de las quinasas dependientes de ciclina, como CDKN2A, o la pérdida de 10q, conducen a una respuesta más reducida a los agentes

quimioterapéuticos (Ino *et al.*, 2001, Cairncross *et al.*, 1998, Bissola *et al.*, 2002, Smith *et al.*, 2000).

Las células madre en GBM humano como el factor de resistencia y recurrencia tumoral

Recientes hallazgos identifican la existencia de un origen del GBM derivado de células madre de gliomas (Ignatova *et al.*, 2002). Las células madre de glioma (Glioma Stem cells) son cruciales para su malignidad. (Patrawala *et al.*, 2005, Holland *et al.*, 2000).

El tratamiento de GBM con los métodos estándar parece conducir a la resistencia a la quimioterapia y radioterapia. Las células madre pueden ser detectadas y aisladas utilizando el marcador CD133. Liu *et al.* demostraron que las células positivas para CD133 muestran altos niveles de ARNm de genes que inhiben la apoptosis y son significativamente resistentes a los agentes quimioterapéuticos como TMZ o BCNU (Liu *et al.*, 2006). Además, sólo pequeñas fracciones de GSCS son necesarias para regenerar el tumor.

La recurrencia de los tumores GBM está, por tanto, muy probablemente provocada por las células madre resistentes, después de la cirugía y de la terapia posterior, ya que se ha demostrado que la expresión de CD133 es significativamente mayor en el tejido GBM recurrente en comparación con los tumores recién diagnosticados (Tang *et al.*, 2007).

Las alteraciones en el genoma durante la gliomagénesis, junto con mecanismos celulares de resistencia a la quimioterapia, conducen a un mal pronóstico y una vida media menor de los pacientes con GBM. Por lo tanto, es necesario investigar nuevas vías de tratamiento contra el GBM además de la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, pues éstas se han mostrado insuficientes.

En este sentido, los virus oncolíticos constituyen una nueva oportunidad terapéutica, estando en constante proceso de investigación para llegar a conseguir virus realmente eficaces contra los GBMs.

4. ADENOVIRUS

4.1. Introducción

Hasta principios del siglo XX, la terapia del cáncer se limita a la extirpación del tumor mediante la cirugía. La radioterapia, la quimioterapia y la inmunoterapia se introducen poco a poco como nuevas estrategias de tratamiento. Los virus contra el cáncer comenzaron a utilizarse a finales del siglo XX.

Estos virus están diseñados para seleccionar, replicarse en las células cancerígenas y matarlas sin dañar las células normales. La liberación de la progenie de estos virus lisa las células tumorales resultando en un aumento exponencial de los virus inoculados, potencialmente consiguiendo una regresión del tumor.

En los primeros ensayos clínicos con adenovirus oncolíticos se demostró la seguridad de esta terapia, incluso bajo administración intravenosa. Sin embargo, estos virus tenían una limitación para difundir eficazmente en los tumores sólidos. Además, los adenovirus oncolíticos se enfrentan a las barreras de transporte en el intersticio del tumor, debido en parte a su gran tamaño (90 nm), mucho mayor que los fármacos quimioterapéuticos. También, el tumor sólido presenta características únicas que dificultan el transporte de macromoléculas. Entre ellos, la presencia de alta cantidad de la matriz extracelular (ECM) y de la presión del fluido intersticial en el intersticio del tumor son las principales barreras frente al transporte de fármacos (Guedan *et al.*, 2010).

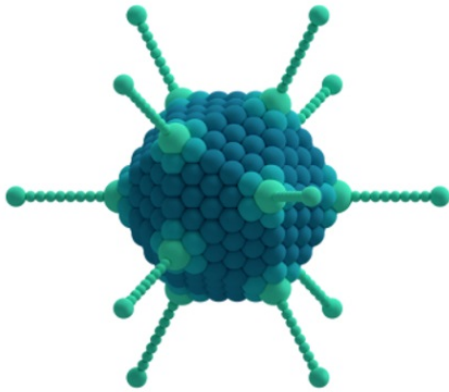
Estructura del virus y ciclo vital

Los adenovirus fueron descubiertos en 1953 y desde entonces, más de 47 serotipos humanos de la familia Adenoviridae se han identificado y han demostrado ser responsables de una variedad de enfermedades, incluyendo enfermedades de las vías respiratorias superiores, conjuntivitis epidémica y gastroenteritis infantil (Rowe *et al.*, 1953).

La mayoría de los estudios sobre la estructura de los adenovirus se han hecho con los serotipos humanos 2 y 5, y han puesto de manifiesto que los adenovirus son partículas

icosaédricas (20 superficies triangulares y 12 vértices) de 70-90 nm de diámetro (Figura 5).

A.



B.

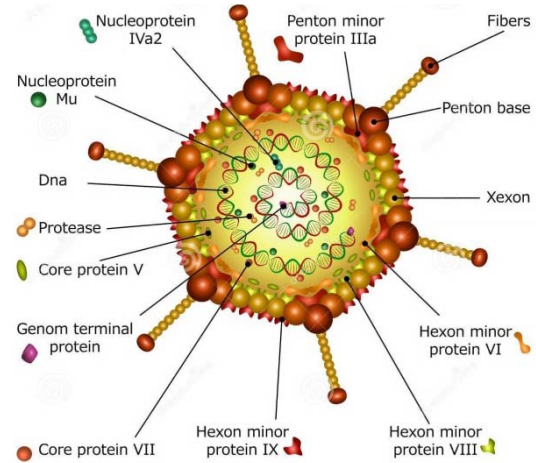


Figura 5. Estructura del adenovirus. A. Modelo tridimensional de un adenovirus con una estructura icosaédrica. B. Representación de un virión de adenovirus. Representa tanto la estructura de las proteínas de la cápside como del núcleo.

El virión tiene una envoltura proteica (cápside) compuesta por 252 subunidades capsómero, compuestos por 240 hexones y 12 pentones. Cada hexón está rodeado por 6 subunidades de pentonas, mientras cada pentón está rodeado por 5 subunidades de hexonas y tiene una fibra que sobresale de su vértice. La fibra contiene proteínas de adherencia vírica. Tanto la pentona como la fibra son inmunógenos y contienen antígenos específicos de tipo (Tabla 1).

Dentro de la cápside, hay 4 polipéptidos junto con una única copia del genoma de ADN bicatenario unido covalentemente en su extremo 5' terminal de la proteína de polipéptido.

Tabla 1. Proteínas virales presentes en los adenovirus.

Principales proteínas de los adenovirus			
Gen	Número	Peso molecular (kDa)	Función
E1A		48	<ul style="list-style-type: none"> Activa la transcripción genética vírica. Se une al supresor del crecimiento celular. Altera el crecimiento celular. Inhibe la activación de elementos de respuesta por la vía de interferón.
E1B			Se une a p53 <ul style="list-style-type: none"> Estimula la transformación. Inhibe la apoptosis.
E2			Proteína terminal del ADN <ul style="list-style-type: none"> Activa algunos promotores. ADN polimerasa
E3			<ul style="list-style-type: none"> Impide la inflamación por el TNF-α
E4			Limita el efecto citopatológico del virus.
AV ARN			<ul style="list-style-type: none"> Inhibe la respuesta al interferón.
Cápside	II	120	Antígeno de familia, algunos artículos de serotipo.
	III	85	Proteína de la base pentona.
	IIIa	66	
	IV	62	Fibra <ul style="list-style-type: none"> Adhesión y hemaglutinación Antígenos de serotipo
	VI	24	Proteínas asociadas al hexón.
	VIII	13	Proteínas asociadas a la pentona.
	IX	12	
Núcleo	V	48	Proteína nuclear 1
	VII	18	Proteína nuclear 2

El genoma adenoviral tiene 36 000 pb de longitud, con capacidad para codificar entre 30-40 genes, y una repetición terminal invertida (ITR) de alrededor de 100-140 pares de

bases en cada extremo, que dirige la interacción del genoma con proteínas encapsulantes.

El genoma contiene 5 unidades de transcripción tempranas (E1A, E1B, E2, E3 y E4), dos primeras unidades retardadas (IX y IVa2) y una unidad tardía principal que se procesa para generar 5 familias de RNAs tardíos (L1- L5).

La proteína E1A activa la transcripción e induce a la célula a entrar en la fase S del ciclo celular. La proteína E1B se une a p53 y estimula la transformación e inhibe la apoptosis. Las proteínas E2 son conocidas por funcionar en la replicación del ADN, activan algunos promotores y la ADN polimerasa (Shenk, 1996). Las proteínas E3 juegan un papel en la modulación de la respuesta del huésped anti-viral de adenovirus, impidiendo la inflamación por TNF- α (Ginsberg *et al.*, 1989). Las proteínas E4 limitan el efecto citopatológico del virus.

Las proteínas tardías son los componentes de la cápside, o proteínas implicadas en el montaje de la cápside.

El ciclo de vida de adenovirus (Figura 6) comienza cuando las fibras pentonas de adenovirus se unen al receptor de superficie celular de alta afinidad. Los dos receptores actualmente conocidos son el receptor CD46 (Gaggar *et al.*, 2003), para los serotipos de adenovirus humano del grupo B y el receptor de virus coxsackie y adenovirus (CAR) (Bergelson *et al.*, 1997; Gaggar *et al.*, 2003), un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas. A continuación, se produce la interacción secundaria, en la cual un motivo RGD dentro de la proteína de la base pentona interactúa con las integrinas $\alpha\beta 3$ y $\alpha\beta 5$ (Wickham *et al.*, 1994; Mathias *et al.*, 1994). Se internaliza y una vez dentro de la célula, se produce una caída del pH dentro de los endosomas y un cambio conformacional en la estructura de la cápside del virus. Después, se libera en el citoplasma (Wickham *et al.*, 1994; Wiethoff *et al.*, 2005). Posteriormente, se dirige al núcleo a través de los microtúbulos y dineína (Leopold *et al.*, 2000). Cuando la cápside alcanza la membrana nuclear, se asocia con la matriz nuclear a través de la interacción con la proteína terminal (Fredman & Engler, 1993). Entonces el genoma entra en el núcleo y comienza la transcripción de genes tempranos.

El proceso de la transcripción génica temprana comienza con la producción de la proteína viral E1A desde el promotor constitutivo E1 y tiene 3 consecuencias

principales. La primera consecuencia es la entrada de la célula en la fase S del ciclo celular, que es cuando el ADN se replica, y esto se logra de distintas maneras, incluyendo la inhibición de pRB por E1A, la inhibición de p53 por E1B-55K y la inhibición directa de la apoptosis por Bcl-2 homólogo E1B-19K. La segunda consecuencia es la inhibición de las respuestas anti-virales. Por ello, se inhibe el interferón β que responde a la proteína E1A. Esto provoca la retención de moléculas del complejo MHC I en el retículo endoplásmico por E3-gp19K. También, se inhibe TNF- α por el complejo E3 14.5K / 10.4K. Consecuencia de ello es que se inhibe la apoptosis mediada por Fas de las células infectadas y la inhibición de la caspasa 8 que desempeña un papel en la apoptosis (Chen *et al.*, 1998). La tercera consecuencia es la síntesis de los productos génicos necesarios para la replicación del ADN viral.

Una vez que los productos de los genes tempranos están sintetizados, los procesos requeridos para la producción del virus son capaces de comenzar. La replicación del ADN se produce en el núcleo y después de la transcripción de los transcritos de los genes tardíos IX y IVa2, el promotor tardío principal se activa por el producto del gen IVa2 y promueve la producción de especies de ARN finales. Las especies de ARN finales se traducen para producir proteínas de la cápside dentro del citoplasma, pero el ensamblaje de la cápside no se produce hasta que estas proteínas se traslocan al núcleo.

El ensamblaje del virus y el embalaje del genoma se producen en el núcleo y el adenovirus no puede ser liberado de la célula hasta que se lisa. Esta lisis celular requiere la interrupción de los filamentos intermedios (que son componentes del citoesqueleto), tales como vimentina y citoqueratina K18, y resulta en el colapso de la célula.

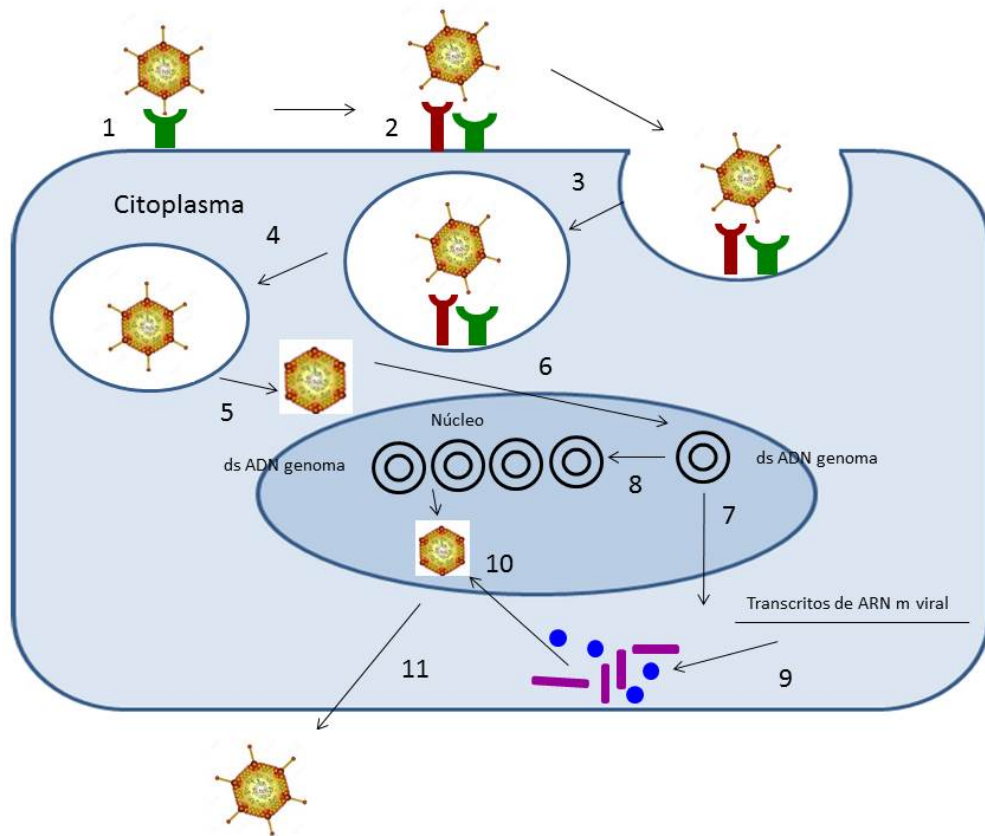


Figura 6. Ciclo de vida del adenovirus. La fibra del adenovirus se une a su receptor primario (CAR) (1) después de lo cual la base pentón interactúa con los receptores secundarios (integrinas $\alpha v \beta 3$ y $\alpha v \beta 5$) (2) y a su vez desencadena el proceso de endocitosis (3). Una vez que la acidificación del endosoma desencadena un cambio conformacional en la cápside viral (4) el virus se libera en el citoplasma y se transloca al (5) núcleo. El genoma viral entra en el núcleo (6) y desde su ubicación episomal se inicia la transcripción (7), a continuación se replica (8). Productos génicos virales se producen en el citoplasma después de la traducción (9) y proteínas de la cápside se localizan en el núcleo donde se produce el ensamblaje del virus (10). Los virus entonces pueden ser liberados de la célula después de la lisis (11).

4.2. Adenovirus Oncolíticos

4.2.1. Delta-24-RGD

Este adenovirus presenta la delección de 24 pares de bases en la región E1A (E1a- $\Delta 24$). Además, el adenovirus Delta-24-RGD (Figura 7) se dirige a las células deficientes en Rb (células tumorales) debido al promotor endógeno de E1A que lo hace selectivo para este tipo de células. Además, presenta el motivo RGD (Arg-Gly-Asp) en la Fibra, que permite el reconocimiento de las integrinas $\alpha v \beta 3$ y $\alpha v \beta 5$ para su internalización en las células tumorales, ya que éstas carecen o no expresan suficientemente el receptor CAR (Receptor de virus Cocksackie y de adenovirus).

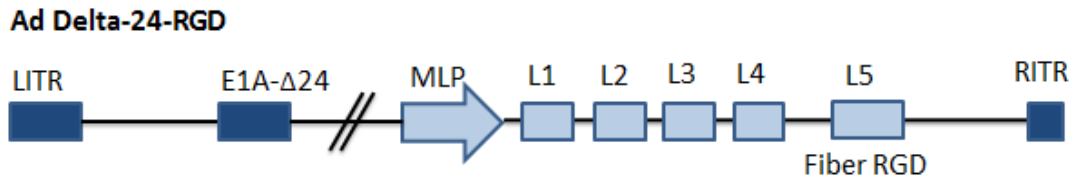


Figura 7. Representación del adenovirus Delta-24-RGD.

Las células madre tumorales del cerebro (BTSCs) se identificaron como la raíz para la iniciación del tumor y resistencia a las terapias (Galli *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2003). En 2004, Fueyo y cols, al aislar estas células del cerebro de gliomas malignos humanos quirúrgicos, concluyeron que era necesario desarrollar nuevas terapias que puedan erradicar esta subpoblación y mejorar el pronóstico de los pacientes con tumores cerebrales. Su grupo informó con anterioridad el efecto antiglioma del adenovirus oncolítico Delta-24-RGD (Alonso *et al.*, 2012). Este virus es selectivo de las células tumorales y fue probado en un ensayo clínico fase I en pacientes con gliomas malignos. También demostraron que el virus Delta-24-RGD infecta, se replica e induce la muerte celular en las células madre tumorales (Alonso *et al.*, 2012). Curiosamente, se observó que las células infectadas con el adenovirus entran en autofagia. La vacuolización citoplasmática está relacionada con la autofagia y podría ser parte del proceso de lisis (Alonso *et al.*, 2012).

El genoma del virus Delta-24-RGD que incluye una delección de 24 pb en la región del gen E1A que codifica los aminoácidos responsables de la unión a proteínas RB y muestra una mayor infectividad a través de la inserción de un motivo RGD al bucle de Fibra HI (Alonso *et al.*, 2012). El virus Delta-24-RGD demostró ser muy eficaz en la inducción de la supresión de tumores cerebrales en ratones (Jiang *et al.*, 2007). Además, este virus también es un agente terapéutico eficaz contra BTSCs. En xenoinjertos derivados de BTSC tratados con Delta-24-RGD, se identificaron proteínas virales, lo que sugiere que este virus es un posible tratamiento para los gliomas humanos tratados con adenovirus oncolíticos en los ensayos clínicos futuros (Jiang *et al.*, 2007).

Por todo ello, hemos utilizado el virus Delta-24-RGD contra el GBM, para comprobar la eficacia antitumoral de este virus. También se comparó su efecto antitumoral con el del adenovirus VCN-01.

4.2.2. VCN-01

Tal y como se ha comentado previamente, la matriz extracelular es muy resistente frente a la liberación y propagación tanto de los tratamientos como de los virus. Por ello, para mejorar la propagación de los virus, una estrategia podría consistir en degradar la matriz extracelular con enzimas proteolíticas. Se comenzó degradando la matriz extracelular, pre-tratando los tumores con tripsina o colagenasa, y se vio que la distribución viral era mejor después de la administración intratumoral (Guedan *et al.*, 2010).

Por ello, se diseñó un virus con una replicación competente que expresaba relaxina, hormona peptídica que modula los niveles de colágeno. Se comprobó que la degradación de la matriz extracelular mejoraba la distribución de los virus y por tanto, la supervivencia de los ratones (Guedan *et al.*, 2010).

El ácido hialurónico es un importante elemento estructural de la matriz extracelular. Es un glicosaminoglicano de alto peso molecular que consiste en unidades repetidas de disacáridos. La degradación del ácido hialurónico con hialuronidasa ha demostrado que mejora la acción de los agentes quimioterápicos en los pacientes (Baumgartner *et al.*, 1998).

Por tanto, se probó la coadministración de hialuronidasa con un adenovirus replicativo y competente, resultando en una mejora de la distribución y de la potencia viral (Ganesh *et al.*, 2008).

El virus VCN-01, constituido por el grupo de Alemany (Guedan *et al.*, 2010), es un adenovirus de replicación competente y selectiva en células tumorales. Uno de los motivos por los que no infecta a células normales es que presenta la modificación RGDK. Las células tumorales tienen una baja expresión del receptor CAR. La expresión del receptor CAR tiende a correlacionar inversamente con el potencial maligno de las células tumorales, incluyendo las de GBM (Giaginis *et al.*, 2008). La modificación RGDK resulta del reemplazo del dominio de KKTK con el motivo RGD. Esta modificación, en el bucle HI de la proteína fibra, promueve la interacción de la fibra con las integrinas $\alpha\beta3$ y $\alpha\beta5$, evitando el receptor CAR, que es deficiente en las células tumorales (Iguchi *et al.*, 2012). Permite, por tanto, a estos virus internalizarse en las células tumorales.

En la terapia viral del cáncer, los niveles de CAR (receptor de virus coxsackie y adenovirus) y Arg-Gly-Asp (RGD) e integrinas de unión, son los principales determinantes de eficiencia de la transferencia génica adenoviral. Por ello, las células tumorales difieren significativamente del tejido normal en la expresión de CAR. Esto se ha demostrado en líneas celulares y tejidos primarios de distintos tumores, entre ellos los tumores cerebrales (Li *et al.*, 1999). Al igual que con otros tipos de cáncer, de diferentes niveles de malignidad, los gliomas exhiben diferente expresión de CAR, y están inversamente relacionados. La expresión de CAR está disminuida en gliomas malignos (Miller *et al.*, 1998, Asaoka *et al.*, 2000) y es apenas detectable en astrocitomas de alto grado (tumores de grado IV o GBM) (Fuxe *et al.*, 2003). Además, la expresión de CAR también se correlaciona con la eficacia de la infección adenoviral (Lamfers *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 1998).

Este adenovirus VCN-01 está basado en el ICOVIR-15K que tiene una mutación en E1A, deleción de 24 pares de bases en la región de E1A (E1a- Δ 24). La modificación RGDK, resultó en un aumento de la bioviabilidad y una mayor eficacia antitumoral respecto del virus parental, ICOVIR-15K (Rodríguez-García *et al.*, 2015). Por otro lado, el adenovirus ICOVIR-5 es un virus oncolítico en el cual el promotor endógeno E1A se ha reemplazado por el promotor humano E2F-1 aislado con DM-1 (myotonic dystrophy locus insulator), y del cual se ha construido el adenovirus ICOVIR-15K. La selectividad del adenovirus ICOVIR-15K se consigue con la inserción de 8 sitios de unión a E2F, que permite una replicación selectiva en células tumorales con la vía de señalización pRB alterada, y un sitio de unión a Sp1 en el promotor endógeno de E1A. Además contiene el péptido RGDK en el bucle HI de la proteína Fibra y una deleción de 24 pares de bases en la región E1A (E1a- Δ 24).

Por tanto, para la constitución del virus VCN-01, se insertaron ocho sitios de unión a E2F y un sitio de unión de Sp1 en el promotor endógeno de E1A que lo hace selectivo para la replicación en células tumorales que tienen la vía de señalización de la proteína del retinoblastoma defectuosa (Guedan *et al.*, 2010).

A continuación se representa la estructura del adenovirus ICOVIR-5 y del adenovirus ICOVIR-15K, en el cual se basa, en parte, la estructura del adenovirus VCN-01 (Figura 8).

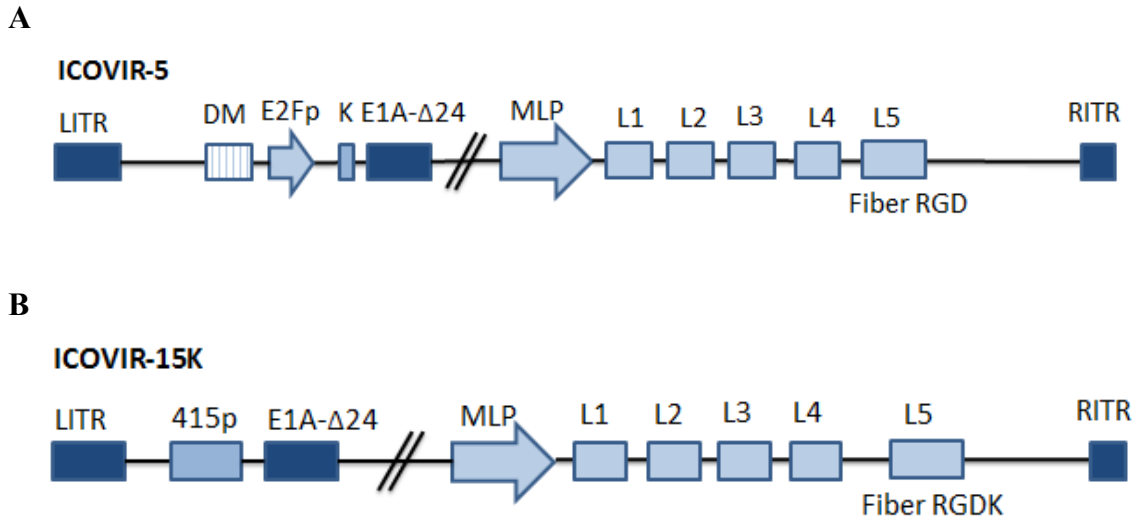


Figura 8. **A.** Representación del adenovirus ICOVIR-5, adenovirus parental del adenovirus ICOVIR-15K. **B.** Representación del adenovirus ICOVIR-15K, adenovirus parental del adenovirus VCN-01.

El virus VCN-01 expresa la enzima hialuronidasa PH20 que expresa bajo el control del promotor principal tardío (MLP), es un glicosilfosfatidilinositol (GPI)-anclada, encontrada en espermatozoides de mamíferos. La hialuronidasa PH20 humana tiene la capacidad de degradar el ácido hialurónico a pH de entre 5 y 8, a diferencia de otras hialuronidasas humanas (como HYAL1 y HYAL2) que sólo son activas a pH ácido (pH 3-4) (Guedan *et al.*, 2010).

Con el fin de obtener una hialuronidasa soluble, se eliminó de la membrana el motivo GPI de unión a PH20. La expresión de la PH20 soluble a través del virus mejora su invasividad. Esta solubilidad se consiguió ya que los virus carecen de la región hidrofóbica responsable de señal de GPI (TMFIVSILFLIISVASL, secuencia aminoacídica de la región C-terminal de PH20). La hialuronidasa degrada el ácido hialurónico y aumenta la propagación intratumoral del adenovirus VCN-01 y mejora, por lo tanto, en gran medida su eficacia antitumoral sin incrementar su toxicidad (Guedan *et al.*, 2010).

El virus parental del que procede es el adenovirus ICOVIR-17. El adenovirus ICOVIR-17 se construyó a partir del adenovirus AdwtRGD-PH20, que a su vez es un adenovirus modificado del adenovirus AdwtRGD.

Por otro lado, al adenovirus ICOVIR-15 se le insertó el ADNc de PH20 del AdwtRGD-PH20. El adenovirus-15 es igual que el adenovirus ICOVIR-15K pero sin la modificación del motivo RGD, por lo que no tiene la lisina (K) en la fibra (RGDK).

Por tanto, este adenovirus (ICOVIR-17) contiene un cassette de PH20 insertado hacia el gen de la fibra, que consiste en una secuencia que permite el empalme (splice acceptor, SA), una secuencia kozak (k) en frente del ADNc de PH20 y la secuencia de poliadenilación (pA) (Guedan *et al.*, 2010). Por tanto, el adenovirus ICOVIR-15 con el cassette de expresión de la hialuronidasa PH20 es el adenovirus ICOVIR-17.

A continuación, se representa la estructura del adenovirus AdwtRGD-PH20 (Figura 9) del cual, junto con el adenovirus ICOVIR-15 se ha construido el adenovirus ICOVIR-17.

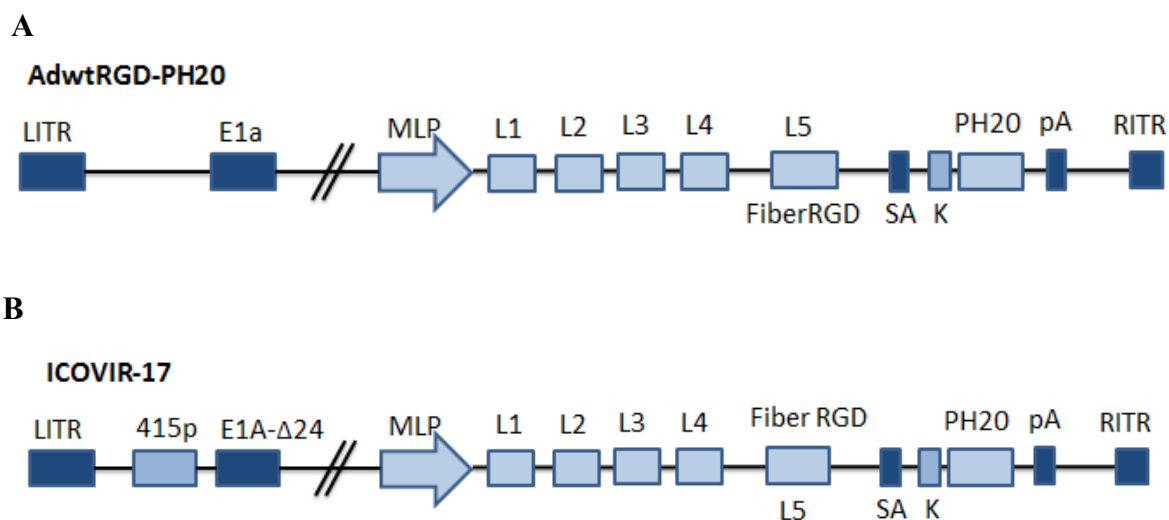


Figura 9. A. Representación del adenovirus AdwtRGD-PH20. B. Representación del adenovirus ICOVIR-17, adenovirus parental del adenovirus VCN-01.

Se ha demostrado *in vivo* que el aumento de la resistencia, en el torrente sanguíneo, asociada con la modificación RGDK de la fibra y la degradación del ácido hialurónico favorecida por la expresión de la hialuronidasa, aumenta el efecto antitumoral sin aumentar la toxicidad de los virus parentales (Rodríguez-García *et al.*, 2015).

A continuación, se representa la estructura del adenovirus VCN-01 (Figura 10).

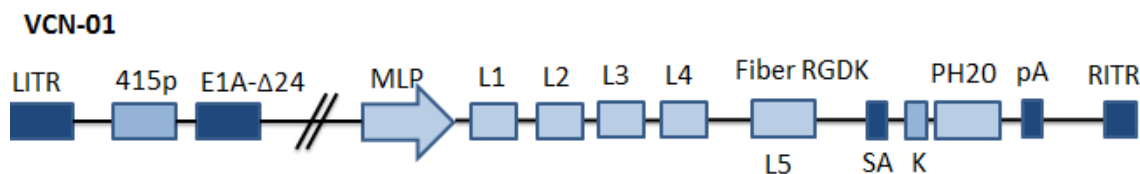


Figura 10. Representación del adenovirus VCN-01.

El grupo de Alemany y cols evaluó la seguridad y eficacia del adenovirus VCN-01 (Rodríguez-García *et al.*, 2015). Primero, hicieron una caracterización del virus; evaluaron la combinación del efecto de RGDK y la hialuronidasa del virus VCN-01 comparándolo con el ICOVIR-15k y el ICOVIR-17 (virus parentales) en distintas líneas tumorales. Obtuvieron una citotoxicidad similar (IC₅₀) del VCN-01 respecto a sus virus parentales. También estudiaron si la replicación era selectiva de células tumorales. Los ensayos se realizaron en fibroblastos quiescentes y demostraron que el virus VCN-01 era menos citotóxico que el adenovirus, no selectivo, AdwtRGDK. Además, obtuvieron los mismos niveles de citotoxicidad del adenovirus VCN-01 y el control negativo no replicativo, AdTLRGDK, en islotes cancerosos de páncreas de pacientes. El adenovirus de tipo salvaje, adenovirus AdwtRGDK, se replica en los islotes de páncreas normales.

Por otro lado, evaluaron la toxicidad del virus en una administración sistémica en ratones inmunocompetentes. Compararon el virus ICOVIR-17 con el VCN-01 y utilizaron el adenovirus 5, wild type (Adwt). Comprobaron el peso, las enzimas hepáticas ALT y AST, parámetros hematológicos y la viremia en distintos momentos. El adenovirus 5 mostró una alta toxicidad y el adenovirus VCN-01 mostró una toxicidad similar al ICOVIR-17. La viremia evaluada fue mayor en los ratones tratados con el virus VCN-01. Además, estudiaron la inmunidad innata y los ratones presentaron niveles de citoquinas elevados, como IFN- γ , IP-10, IL-6 y TNF- α .

También evaluaron la toxicidad sistémica en hámsteres sirios, ya que son más tolerantes a los virus que los ratones. Comprobaron que los parámetros que evaluaron (peso, AST, ALT, ALP, tiempo de protrombina), variaron de forma dosis-dependiente. Además, analizaron la biodistribución del virus VCN-01 en una administración sistémica en ratones. Comprobaron como el virus VCN-01 se encontraba en mayor proporción en los tumores que en el hígado, al contrario que el resto de adenovirus, que tienen un tropismo mayor por el hígado, disminuyendo la efectividad contra los tumores. Finalmente, analizaron la actividad antitumoral del virus VCN-01 por vía sistémica y a

través de administración intratumoral. Compararon el virus VCN-01 con el ICOVIR-17. Los tumores de los ratones tratados con el virus VCN-01 fueron significativamente menores que los tumores de los ratones tratados con el virus ICOVIR-17 en ambos estudios.

Por todo ello, hemos utilizado el virus VCN-01 contra el GBM, para comprobar la eficacia antitumoral de este virus.

Hipótesis y Objetivos

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La descripción de los distintos tumores cerebrales y sus alteraciones genéticas ha demostrado ser una herramienta importante para la mejora en el diagnóstico y clasificación de los pacientes que los padecen. Sin embargo, los avances en el tratamiento de estas enfermedades no han ido a la par y a pesar de todos los esfuerzos terapéuticos estos pacientes siguen sucumbiendo a la enfermedad.

Por lo tanto, es obvio que el tratamiento de los tumores cerebrales malignos es subóptimo y se necesitan nuevas estrategias terapéuticas más eficaces que alarguen no solo la vida de los pacientes, sino también la calidad de la misma.

Los adenovirus oncolíticos diseñados para replicarse y destruir a las células tumorales representan una estrategia terapéutica muy prometedora que podría mejorar el pronóstico de los pacientes con estos tumores. Delta-24-RGD y VCN-01 son adenovirus oncolíticos diseñados para replicarse específicamente en células que presentan alteración de la vía de RB. Además, el virus VCN-01 incorpora la enzima hialuronidasa que le permite una mejor distribución en el tumor.

Hipotetizamos que los adenovirus oncolíticos Delta-24-RGD y VCN-01 serán eficaces, no solo contra el grueso del tumor, sino también contra las células madre tumorales responsables de la recurrencias.

Para demostrar nuestra hipótesis planteamos los siguientes objetivos:

Objetivo 1: Analizar y comparar el efecto del virus Delta-24-RGD y VCN-01 en Tumores Embrionarios Neuroectodérmicos Supratentoriales.

Objetivo 2: Evaluar el efecto antitumoral del virus VCN-01 en glioblastoma multiforme de adultos.

Materiales y Métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Líneas celulares

Para el estudio del efecto antitumoral de los adenovirus oncolíticos Delta-24-RGD y VCN-01 en tumores neuroectodérmicos primitivos (PNETs) se han utilizado las líneas celulares PFSK-1 y SK-PN-DW. Estas líneas se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC). La línea celular PFSK-1 fue mantenida con el medio de cultivo RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium) (Gibco ®, Life Technologies, NY, EE.UU). La línea celular SK-PN-DW fue mantenida con el medio de cultivo DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) (Gibco ®, Life Technologies, NY, EE.UU). Ambas líneas fueron suplementadas con suero fetal bovino (Gibco ®, Life Technologies) al 10% y 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco ®, Life Technologies, NY, EE.UU). La línea celular SK-PN-DW, además fue suplementada con EGF (20 ng/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU), bFGF (20 ng/ml, BIONOVA s.l. Científica, Madrid, España) y B27 (1:50; Gibco ®, Life Technologies, NY, EE.UU). Ambas fueron cultivadas en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂ a 37°C.

Por otro lado, para el estudio del efecto antitumoral del virus VCN-01 en GBM, se han empleado seis líneas celulares de este tipo tumoral (A172, U373 MG, U251 MG, T98G, SNB19 y U87 MG) que fueron obtenidas de la ATCC. Fueron mantenidas con el medio de cultivo DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium)/F12 (Gibco ®, Life Technologies, NY, EE.UU) (1:1, v/v) suplementado con suero fetal bovino (Gibco ®, Life Technologies) al 10% y 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco ®, Life Technologies, NY, EE.UU) en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂ a 37°C.

También se evaluó el efecto antitumoral del virus VCN-01 en las células obtenidas de cultivo primario, GSC11 y GSC23. Se mantuvieron en medio de células madre neurales que contiene DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium)/F12 (Gibco ®, Life Technologies, NY, EE.UU) (1:1, v/v), suplementado con EGF (20 ng/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU), bFGF (20 ng/ml, BIONOVA s.l. Científica, Madrid,

España), B27 (1:50; Gibco ®, Life Technologies, NY, EE.UU) y 1% de penicilina/estreptomicina en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂ a 37°C.

Por otro lado, la línea 293, línea embrionaria de riñón humano transformada con el adenovirus serotipo 5 de E1A y la línea GL261, línea de GBM de ratón, fue mantenida con el medio de cultivo DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) (Gibco ®, Life Technologies, NY, EE.UU) suplementado con suero fetal bovino (Gibco ®, Life Technologies, NY, EE.UU) al 10% y 1% de penicilina/estreptomicina en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂ a 37°C.

La línea A549, línea de carcinoma de pulmón humano, se utilizó únicamente para la amplificación viral del adenovirus VCN-01 y se mantuvo en cultivo con medio DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) suplementado con suero fetal bovino (Gibco ®, Life Technologies, NY, EE.UU) al 10% y 1% de penicilina/estreptomicina en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂ a 37°C.

Las líneas celulares fueron congeladas en criotubos con 90% de FBS y 10% de DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU) utilizando un congelador de células con isopropanol que permite disminuir la temperatura 1°C cada minuto hasta -80°C. Las líneas celulares que no se cultivaron con FBS, se congelaron con un 90% del medio de cultivo y el 10% de DMSO.

En la siguiente tabla se resumen todas las líneas mencionadas (Tabla 2).

Tabla 2. Representación de las líneas celulares utilizadas junto con el origen del que provienen.

Línea celular	Origen
A172	Células de glioblastoma humano
U373 MG	Células de glioblastoma humano
U251 MG	Células de glioblastoma humano
T98G	Células de glioblastoma humano
SNB19	Células de glioblastoma humano
U87 MG	Células de glioblastoma humano
GSC11	Células madre tumorales neurales de cerebro humano
GSC23	Células madre tumorales neurales de cerebro humano
GL261	Células de glioblastoma murino
PFSK-1	Células de Tumor Neuroectodérmico Primitivo
SK-PN-DW	Células de Tumor Neuroectodérmico Primitivo
293T	Células embrionarias de riñón humano transformadas con el gen E1A del adenovirus serotipo 5
A549	Células de carcinoma de pulmón humano

1.2. Adenovirus

Por otro lado, durante este trabajo se han utilizado dos adenovirus. Uno es el adenovirus Delta-24-RGD y otro es el adenovirus VCN-01.

2. MÉTODOS

2.1. Amplificación viral

Cabe destacar que para poder realizar estos estudios *in vivo* e *in vitro* se tuvo que amplificar el virus en la línea A549. Se inició el experimento con una placa p100 con una confluencia del 80% y se infectó con 6 MOIs del virus VCN-01. A las 48 h se recogieron las células infectadas y se separó el sobrenadante del pellet. Se añadió glicerol al 80% al sobrenadante y Tris 10mM pH 8,1 al pellet. Posteriormente, se hicieron tres ciclos de congelación (-80°C) y descongelación (baño a 37°C) antes de continuar con el siguiente paso. Este proceso se repitió en todos los pasos (Figura 11).

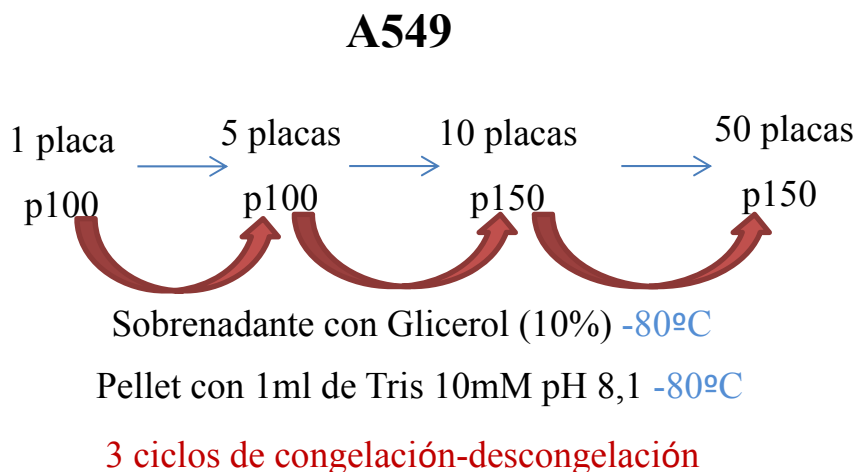


Figura 11. Pasos seguidos durante la amplificación viral hasta conseguir el pellet de las 50 placas.

Al finalizar estos pasos, se recogieron las 50 placas y se recuperó el pellet haciendo las centrifugaciones necesarias. Se añadieron 10 ml de Tris 10 mM pH 8,1, se mezcló bien con el pellet y se congeló a -80°C. Se hicieron los 3 ciclos de congelación y descongelación y se centrifugó 20 min a 3500 rpm a 4°C.

Para la preparación de la columna de gradiente de cesio, se pusieron en orden 3 ml de buffer de cesio 1,5 gr/ml, 7 ml de buffer de cesio 1,35 gr/ml, y finalmente 7 ml de buffer de cesio 1,25 gr/ml; y se añadió todo el sobrenadante de la centrifugación del pellet. Es importante evitar las burbujas y rellenar la columna con Tris 10 mM. Se selló la columna y se hizo una ultracentrifugación a 25000 rpm, 4°C, durante toda la noche.

Al día siguiente, se sacó la columna de la ultracentrífuga (Figura 12), pinchamos con una aguja la parte de arriba de la columna, y mientras con la otra aguja acoplada a la jeringa se absorbió la línea de virus. Respecto a los mililitros de virus cogidos, es recomendable no recoger más de 5,2 ml de virus. Los virus recogidos se ponen en un Falcon de 15 ml y se pesa 1 ml en un Eppendorf, debiendo pesar 1,35 gr. En caso contrario, si pesa más, se añade Tris 10 mM, y si pesa menos, se añade cesio en polvo (el límite está en 1,38 gr o 1,31 gr).

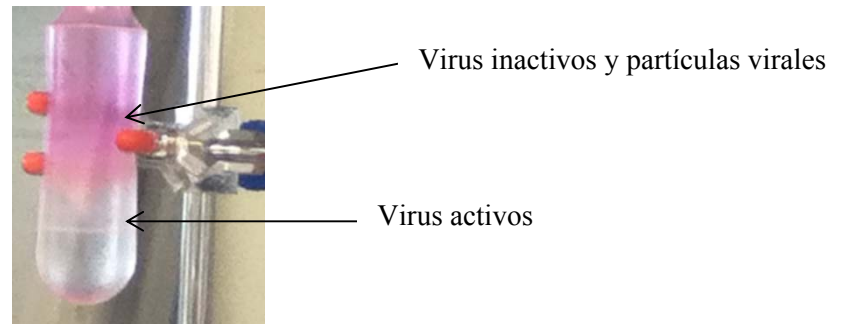


Figura 12. Columna obtenida en la primera ultracentrifugación. Se puede observar la línea de los virus activos (blanca). También se pueden observar los virus inactivos y las partículas virales (línea rosácea).

A continuación, preparamos la columna para la segunda ultracentrifugación. Se añade el virus sacado de la centrifugación anterior y se completa con buffer de cesio 1,35 gr/ml. Se vuelve a centrifugar a 30000 rpm, 4°C, durante toda la noche. Al día siguiente se sacó el tubo y se sujetó con el pie de pato. Se repite la operación del día anterior, con una aguja se pincha la parte de arriba del tubo y con otra aguja acoplada en una jeringa se pincha 2-3 cm por debajo de la línea de partículas virales y se absorbe la línea viral. En este caso, solo se pueden llevar 3 ml. Se puso el virus en un Falcon de 15 ml y se incubó en hielo.

Una vez acabadas las centrifugaciones, se comenzó con la cromatografía de exclusión.

1. Primero se procede con la preparación de la columna (Figura 13):

Se rompe la pipeta de 14 ml por la altura de 12-13 ml. Se pone una pelota de lana de vidrio en el interior de la pipeta hasta la punta, siempre con las manos previamente mojadas en etanol. En la punta de la pipeta se pone la punta de una pipeta pasteur de 3

ml, cortada la punta por la altura de 1,5 ml, y se sella con parafilm. Finalmente se sujeta la columna en el pie de pato y se pone un reservorio debajo de ella.

2. Compactación y elución de la columna:

Se añade sephadex que se debe ir compactando hasta llegar a los 10 ml. Una vez que se ha compactado se lava con 10 ml de Tris. La columna nunca debe quedarse seca.



Figura 13. Columna de exclusión compactada con sephadex.

Mientras se compacta y se lava, se puede ir preparando:

- 12 Eppendorf
- 12 cubetas

Se prepara el buffer para las muestras:

➤ 4888 μ l Tris 0,1 M y 52 μ l SDS 10x

Luego, se añade 380 μ l del buffer a cada cubeta y 20 μ l de virus de cada fracción:

También se prepara el buffer blanco:

➤ 396 μ l Tris 0,1M y 4 μ l SDS (10x)

Una vez se ha terminado el lavado, se añade el virus y cuando todo el volumen de virus ha entrado en la columna, se añade Tris 0,1 M. En este momento se empiezan a recoger

fracciones en los Eppendorf numerados previamente. En la primera fracción se recoge 1 ml y las siguientes fracciones serán de 0,5ml. Se van dejando todas las fracciones en hielo. Al terminar con la última fracción se sella la pipeta Pasteur con un mosquito.

3. Comprobación de la carga viral en las diferentes fracciones:

Se añade 20 µl de cada fracción en su correspondiente cubeta y se mide la absorbancia (en una longitud de 260 nm).

- ✓ Los valores superiores de 0,02 implican la presencia de virus.
- ✓ El índice 260/280 indica la pureza del virus y debe estar entre 1,5 y 1,3.

Finalmente, se juntan las fracciones donde aparecen los valores virales, y se añade glicerol al 10%.

Una vez que el virus se ha purificado hay que comprobar que tiene la secuencia correcta. Para ello, se extrajo el ADN viral del sobrenadante mediante el kit de Roche® High Pure Viral Nucleic Acid Kit y se amplificaron por PCR los genes PH20, fibra, E1A y E2F, genes característicos del virus VCN-01. Se utilizaron los siguientes cebadores (Tabla 3):

Tabla 3. Cebadores utilizados en el análisis de la secuencia del virus VCN-01 mediante PCR.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)	T _m	% G+C
PH20 left	TACACACTCCTTGCTCCTGG	20	54,7°C	55%
PH20 right	CTTAGTCTACAGAGGCCAC	20	56,5°C	50%
Fiber RGDK left	GCCACAGTTAGGGCTTCTGA	20	62°C	55%
Fiber RGDK right	TTACCTCCAATGGCATGCTT	20	58°C	45%
Fiber kozak left	ACGGTACACAGGAAACAGGA	20	55,9°C	50%
Fiber kozak right	GCAACATGGAATCAGAAGGAA	21	60°C	45%
E1A left	TGCATGGCGTGTTAAATGG	18	59,2°C	33,33%
E1A right	ATGAGACATATTATCTGC	19	62,4°C	47,36%
E2F left	TTTCTCAGGTGTTTTCCGCG	20	55,9°C	50%
E2F right	CAACTTTGACCCCGTACAGC	20	56,2°C	55%

Las condiciones de los ciclos para las distintas PCR fueron los siguientes:

- ✓ PH20: 10 min a 94°C, 30 s a 94°C, 30 s a 55°C, 1 min a 72°C, 7 min a 72°C y 4°C ∞ durante 45 ciclos.
- ✓ Fibra RGDK: 10 min a 95°C, 30 s a 95°C, 30 s a 60°C, 1 min a 72°C, 7 min a 72°C y 4°C ∞ durante 35 ciclos.
- ✓ Fibra Kozak: 10 min a 95°C, 30 s a 95°C, 30 s a 55°C, 1 min a 72°C, 7 min a 72°C y 4°C ∞ durante 35 ciclos.
- ✓ E1A: 10 min a 95°C, 30 s a 95°C, 30 s a 59°C, 1 min y 30 s a 72°C, 7 min a 72°C y 4°C ∞ durante 38 ciclos.
- ✓ E2F: 10 min a 94°C, 30 s a 94°C, 30 s a 55°C, 1 min a 72°C, 7 min a 72°C y 4°C ∞ durante 45 ciclos.

Una vez realizadas las reacciones de PCR, el producto se somete a electroforesis en un gel de agarosa 1% para comprobar que la PCR ha salido bien, si es así, se secuencian los distintos genes. Para la secuenciación, se purifica el producto de la PCR con el kit de GE Healthcare Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit.

Por otro lado, se comprueba el título funcional del virus amplificado. Se realiza por triplicado un ensayo de replicación comparando con un virus del que ya se conoce el título utilizándolo como control positivo. Es recomendable obtener títulos elevados de 10^{10} , 10^{11} o 10^{12} para poder realizar los distintos experimentos, sobre todo, los experimentos *in vivo*.

2.2. Ensayos de viabilidad celular

Para medir la tasa de proliferación y supervivencia celular, uno de los sistemas más utilizados es el ensayo colorimétrico cuyo reactivo es MTT [3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazolio Bromuro] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU) (Mosmann, 1983). Se basa en la reducción metabólica del MTT que se realiza por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Por tanto, mide exactamente la supervivencia y la proliferación celular. La cantidad de células vivas es directamente proporcional a la cantidad de formazán producido.

Para analizar la proliferación de las células de PNETs y GBM, primero, se realizó una curva de crecimiento de 6 días con distinta cantidad de células. Se sembraron 500 células por pocillo, 1000 células, 1500 células, 2000 células, 2500 células y 3000 células en placas de 96 pocillos, 4 pocillos para cada condición. Se dejan creciendo durante 6 días cambiando el medio en el tercer día. En el sexto día se leen usando el reactivo MTT. La absorbancia tiene que estar entre 0,200 (mínimo) y 1,2 (máximo o saturado).

Las líneas celulares de PNETs (PFSK-1 y SK-PN-DW) fueron sembradas a 2000 células por pocillo por quintuplicado en una placa estéril de 96 pocillos. Al día siguiente, las células fueron infectadas con el adenovirus Delta-24-RGD a diferentes MOIs (Multiplicity of Infection) 5, 10, 25, 50, 100. Posteriormente, estas mismas líneas

celulares se infectaron a las siguientes MOIs: 1, 5, 10, 20, 40, con el adenovirus VCN-01. Hay que destacar que las líneas celulares que crecen en suspensión, como las neuroesferas y las SK-PN-DW, tuvieron que ser sembradas en placas de 96 pocillos con laminina para que permanecieran pegadas a los pocillos. Estas placas con laminina se prepararon de la siguiente manera:

1. Se descongela lentamente la laminina recombinante entre + 2°C y + 8°C antes de su uso.
2. Se diluye la solución madre de laminina con 1xDPBS (Ca⁺⁺/ Mg⁺⁺) a una concentración de 10 mg/ml.
3. Se añadieron 25 µl/pocillo y se incubó a 37°C durante 2h.
4. Después, las placas se guardaron hasta 4 semanas a 4°C, almacenadas de forma aséptica, añadiendo 1xDPBS adicional (Ca⁺⁺/Mg⁺⁺) para evitar que la placa se secase. Cuando se utiliza la placa revestida para el cultivo celular, sólo se tiene que aspirar el líquido de recubrimiento y añadir cultivo celular. El revestimiento de la laminina no requiere lavado antes de su uso.

Las líneas celulares U87 MG, A172, U251 MG, U373 MG, SNB19 fueron sembradas a 1000 células por pocillo por quintuplicado en una placa estéril de 96 pocillos y fueron infectadas únicamente con el adenovirus VCN-01 a MOIs de entre 0 y 40, siendo 0 MOIs el control negativo. La línea celular T98G fue sembrada a 1000 células por pocillo e infectada a MOIs de entre 0 y 100. Las células madre neurales GSC23 y GSC11 fueron sembradas a 2000 células por pocillo y fueron infectadas con unas MOIs de entre 0 y 250, por ser más resistentes. La línea celular GL261 fue sembrada a 1000 células por pocillo y posteriormente fue infectada con MOIs de entre 0 y 500. Se eligieron las MOIs de 100, 250 y 500 de T98G, GSC11 y GSC23 y GL261, por ser las líneas celulares más resistentes. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

La línea celular GL261 se utilizó para comprobar la eficacia del virus en distintas líneas celulares y ver si hay alguna línea resistente al virus. Al ser una línea celular murina, aunque el virus infecte esta célula tumoral no será capaz de replicarse.

La viabilidad celular fue medida 5 días después usando el reactivo MTT (Sigma-Aldrich). Se añadió 20 µl del reactivo MTT por pocillo y se incubaron las células entre

1-4 horas a 37°C en atmósfera húmeda con un 5% de CO₂ hasta alcanzar el rango lineal en la reacción. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm, en un espectrofotómetro Sunrise Promote (TecanGroup Ltd. Homrechtikon, Suiza), empleando el programa Magellan. El cálculo de las medias se realizó mediante Excel. Posteriormente, las curvas de dosis-respuesta fueron analizadas utilizando el software CalcuSyn (Biosoft, Cambridge, UK). Se obtuvo el dato de la IC₅₀, que es la mediana de la dosis-efecto (la dosis que causa la muerte al 50% de las células, es decir, un 50% de supervivencia) y la desviación estándar.

2.3. Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario

La extracción del ARN total de cada línea celular indicada se realizó con Trizol[®] (Life technologies, Carlsbad, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad del ARN fue analizada en el bioanalizador Experion de BioRad y cuantificada por medio del Nanodrop (Nucliber, Madrid, España)

De cada muestra utilizamos 1 µg de ARN para la realización de la retrotranscripción, paso de ARNm a ADNc. Para ello, utilizamos el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life technologies, Carlsbad) en el termociclador Gene Amp PCR 2700 (Perkin Elmer, Waltham, MA) aplicando las siguientes condiciones: 10 min a 25°C y 2 h a 37°C. Después lo mantuvimos a 4°C.

2.4. RT- PCR cuantitativa

Para cuantificar la expresión de los transcritos de ARNm de las proteínas del virus VCN-01 (PH20 y Fibra) realizamos una PCR cuantitativa. La síntesis del ADNc se realizó de manera indicada anteriormente. Cada ADN obtenido se analizó por triplicado en el sistema de PCR 7900TH Fast Real-Time utilizando el Master Mix Fast SYBR[®] Green (Life technologies, Carlsbad, CA). La cantidad de ADNc utilizado para las reacciones variaba entre los diferentes genes, encontrándose en un rango entre 1 y 25 ng de ADNc por reacción. Como control interno se utilizó la cuantificación de GAPDH humano. Las reacciones se llevaron a cabo con las siguientes condiciones: 20 s a 95°C

para el ciclo 1, y 15 s a 95°C, 20 s a 60°C durante 40 ciclos. En la tabla 4 se detallan los cebadores utilizados.

Tabla 4. Cebadores utilizados en el análisis de la expresión cuantitativa de los genes PH20 y Fibra.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)	Tm	% G+C
PH20-left	CTTAGTCTCACAGAGGCCAC	20	62°C	55%
PH20-right	CCAGGAGCAAGGAGTGTGTA	20	62°C	55%
Fiber-left	ATTTGCCACATCCTCTTACAC	21	60°C	42,8%
Fiber-right	CAAACGCTGTTGGATTTATG	20	56°C	40%

El cambio del Ciclo Umbral (ΔCt o dCT) de cada muestra se calculó como la diferencia entre el valor Ct del gen de interés menos el valor de Ct de GAPDH (control endógeno). Es decir, el $\Delta\Delta Ct$ de cada muestra se obtuvo restando el valor de ΔCt del estado control (líneas no infectadas) del valor de ΔCt del estado del gen en las líneas infectadas. Posteriormente, se calculó el $2^{-\Delta\Delta Ct}$ representando en las figuras 26 y 41, la correlación de los genes PH20 y Fibra en las distintas líneas celulares y condiciones (Schmittgen & Livak, 2008).

2.5. Análisis mediante citometría de flujo de los receptores Integrina $\alpha\beta 3$, Integrina $\alpha\beta 5$ y CAR.

Para analizar la expresión de la superficie celular de las proteínas de membrana, las Integrinas y CAR, sembramos tanto la línea celular PFSK-1 como la línea SK-PN-DW en placas de 6 pocillos: unas 250.000 células/pocillo de cada línea. Se recogieron y se incubaron con el anticuerpo anti-CAR (Santa Cruz Biotechnology ®) (anticuerpo monoclonal diluido 1:2000), el anticuerpo de ratón anti-Integrina humana $\alpha\beta 5$ (© Merck Millipore, CA), (diluido 1:400) y el anticuerpo anti-Integrina humana $\alpha\beta 3$ de ratón conjugado con fluoresceína monoclonal (© Merck Millipore, CA) (diluido 1: 200)

a 4°C durante 1 hora. El buffer de incubación consta de PBS, 0,5% BSA, 2 mM de Hepta). Después se lavó con el buffer de incubación (PBS, 0,5% BSA 2 mM de Hepta). Posteriormente, se incubó durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad con un anticuerpo secundario IgG-FITC (Santa Cruz Biotechnology ®) (dilución 1:400) que posee fluorescencia, en el caso de CAR e Integrina $\alpha\beta 5$. En el caso del anticuerpo primario de la Integrina $\alpha\beta 3$ no necesita anticuerpo secundario ya que el primario posee fluorescencia. Una vez incubado, se volvió a lavar con PBS, 0,5% BSA 2 mM. Las muestras celulares se analizaron mediante citometría de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson [BD], San Jose, CA, USA) usando un láser azul de 488 nm para la excitación. La fluorescencia verde se detectó con un filtro de paso de banda de 510-530 nm, y todos los datos de citometría se analizaron con el software BD CellQuest. La expresión se definió como alta cuando se expresó en el 50% o más de las células examinadas y baja cuando se expresó en menos de 50% de las células examinadas.

2.6. Análisis mediante citometría de flujo de la infectividad a través del dominio RGD del virus

Para analizar la infectividad del adenovirus Delta-24-RGD contamos con un adenovirus no replicativo que infecta a través del dominio RGD y expresa la proteína verde GFP. Para ello, se sembraron 1×10^5 células de PNETs en placas de 6 pocillos y se infectaron a la vez de la siembra. Las células de PNETs se infectaron con el virus GFP-RGD a MOIs de 10 y 100. A las 24 horas se recogen y se analiza el porcentaje de células verdes mediante citometría de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson [BD], San Jose, CA, USA) usando un láser azul de 488 nm para la excitación. La fluorescencia verde se detectó con un filtro de paso de banda de 510-530 nm, y todos los datos de citometría se analizaron con el software BD CellQuest. La expresión se definió como alta cuando se expresó en el 50% o más de las células examinadas y baja cuando se expresó en menos de 50% de las células examinadas.

2.7. Análisis de proteínas mediante *Western blot*

Para la realización de la técnica de *Western blot*, se infectaron 2×10^6 células de las líneas de PNETs con distintas dosis de MOIs con el adenovirus Delta-24-RGD (5, 10,

50 y 100) y las MOIs de 1 y 10 con el adenovirus VCN-01. Las neuroesferas, las líneas celulares de GBM fueron infectadas a las MOIs de 1 y 10 con el adenovirus VCN-01. La línea GL261 fue infectada a dos dosis diferentes de MOIs (100 y 300) con el adenovirus VCN-01. Se utilizó como control las células no infectadas.

Se recogieron las células, tanto infectadas como no infectadas, en cultivo mediante centrifugación (5 minutos a 500 r.c.f) y se lavaron dos veces con PBS (Gibco). El precipitado celular se resuspendió en 100 µl de tampón de lisis (PBS, 1% Tritón X-100, inhibidores de proteasas 1X (Roche Diagnostics)) y se incubó durante 30 minutos a 4°C. Tras centrifugar a 16.000 r.c.f. durante 10 minutos, la proteína soluble se cuantificó mediante el método *BCA Protein Assay* (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) según las instrucciones del fabricante, utilizando la albúmina sérica bovina (BSA) (1 mg/ml) (Thermo Scientific, NY, EE.UU) para realizar la curva patrón.

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) por el método de Laemmli *et al* utilizando el sistema *Mini-Protein III* (Bio-Rad) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa utilizando el dispositivo *Mini-Trans-blot* de transferencia (Bio-Rad, Berkeley, CA, USA) (Laemmli *et al.*, 1970). El inmunorevelado se llevó a cabo en cuatro etapas, realizando entre cada una de ellas tres lavados de 10 minutos cada uno con un tampón PBS-Tween (PBS y 0,1% Tween 20). Primero, se bloquearon las membranas de nitrocelulosa (Amersham, GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) durante dos horas a temperatura ambiente con tampón de bloqueo (PBST, 5% leche desnatada Sveltesse, Nestlé, Vevey, Suiza). Posteriormente, se incubó con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 5) diluido en tampón de bloqueo durante dos horas a temperatura ambiente. Seguidamente, se incubó con el anticuerpo secundario apropiado diluido (Tabla 6), en tampón de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, la visualización de las bandas se realizó mediante quimioluminiscencia (*Lumi-Light^{PLUS} Western Blotting Substrate*, Roche Diagnostics). Como control de carga se utilizó la detección de GRB2 con un anticuerpo específico como se indica en la tabla 5.

Tabla 5. Anticuerpos primarios utilizados en la técnica de WB.

Anticuerpo primario	Especie	Casa Comercial	Dilución
E1A	Conejo	Santa Cruz Biotechnology®	1:1000
Fibra	Ratón	Thermo Scientific, NY, EE.UU	1:1000
GRB2	Ratón	Cell Signalling, Danvers, MA	1:1000

Tabla 6. Anticuerpos secundarios utilizados en la técnica de WB. (HRP, *Horseshoe peroxidase*).

Anticuerpo secundario	Especie	Casa Comercial	Dilución
Anti-IgG de ratón-HRP	Cabra	Promega (Madison, WI, USA)	1:10000
Anti-IgG de conejo-HRP	Cabra	Promega (Madison, WI, USA)	1:10000

2.8. Ensayos de replicación viral

La replicación viral, o cuantificación viral, consiste en contar el número de virus en un volumen específico para determinar la concentración vírica. Para ello, se sembraron 1×10^5 células de PNETs, GBM y GL261 en placas de 6 pocillos. Se infectaron a la vez que se sembraron. Las células de PNETs se infectaron con el virus Delta-24-RGD a la MOI de 10, dos veces. Por otro lado, estas células también se infectaron con el adenovirus VCN-01 a las MOIs de 1 y 10, todas en un volumen final de 1 ml. Las líneas de GBM y las neuroesferas fueron infectadas con el adenovirus VCN-01 a 1 y 10 MOIs. La línea GL261 se infectó con el adenovirus VCN-01 a 100 MOIs y a 300 MOIs dos veces. Tres días después, se recogieron y se continuó con el método TCID₅₀ (tissue culture infection dose replication assay) para determinar el título de la infección viral (Cascallo *et al.*, 2007). Sin embargo, una de las dos veces que se infectó la PFSK-1 y

SK-PN-DW a 10 MOIs con el adenovirus Delta-24-RGD se recogió a las 12 horas. Una de las dos veces que se infectó la GL261 a 100 MOIs se recogió a las 4 h y este dato se utilizó como control. Posteriormente, se sometieron las células a:

1. Tres ciclos de congelación y descongelación de las células con el sobrenadante (medio de cultivo en el que estaban creciendo) que se obtiene al recoger las células de cada pocillo de la placa de 6 pocillos a su correspondiente Eppendorf (para cada línea celular y condición de infección).
2. Posteriormente, se centrifugaron durante 5 min a 4°C y se separó el sobrenadante de los restos de células. Se mantuvo el sobrenadante en hielo y se desecharon los restos de células.
3. Se prepararon las siguientes diluciones de virus (stock) en una placa de 96 pocillos planos por triplicado en un volumen final de 100 µl con medio DMEM sin suero fetal bovino ni antibióticos.

Stock ----- 10⁻⁴ ----- 10⁻⁵ ----- 10⁻⁶ ----- 10⁻⁷ ----- 10⁻⁸ ----- 10⁻⁹ ----- 10⁻¹⁰ ----- 10⁻¹¹

4. Se añadieron 100.000 células de la línea celular 293T por pocillo, en un volumen final de 50 µl utilizando medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino a cada pocillo con las diluciones de virus.
5. Se incubaron 36 h a 37°C y 5% de CO₂.
6. Una vez pasadas las 36 h, se quitó el medio de la placa y se dejó secar los pocillos durante 5 min. Entonces se añadieron 100 µl de metanol frío, y se incubó durante 10 min a -20°C.
7. Se retiró el metanol y se hicieron 3 lavados a las células con PBS++ (Gibco ®, Life Technologies, NY, EE.UU) 1% de BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU). El último lavado tiene que tener una incubación de 5 min.
8. Una vez pasados los 5 min se retiró el PBS++ 1% de BSA y se añadió el anticuerpo primario 2Hx-2 (Hexón) diluido ½ con PBS++ 1% de BSA y se incubó durante 1-2 h a temperatura ambiente y en oscuridad.
9. Tras 1 ó 2 h se hicieron 4 lavados a las células con PBS ++ 1% de BSA.

10. Se añadió el anticuerpo secundario, conjugado con un fluorocromo, FITC (Santa Cruz Biotechnology ®, inc., Texas, EE.UU) diluido 1/400 con PBS++ 1% de BSA y se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 1 h.
11. Tras 1 h, se lavaron las células 4 veces con PBS ++ 1% de BSA.
12. Una vez hechos los lavados se procedió a cuantificar la replicación en el microscopio de fluorescencia. Se calculó la replicación viral mediante la siguiente fórmula siendo X, la media de los puntos verdes de los tres pocillos.

$$Pv/ml \text{ (Partículas virales/ml)} = X \cdot \text{Factor de dilución} \cdot 10$$

El cálculo de la replicación viral fue realizado por triplicado, tanto para cada línea celular de PNETs, GBM, neuroesferas y la línea celular GL261.

2.9. Estudios con animales

La aprobación ética fue concedida por el Comité de Ética Animal de la Universidad de Navarra (CEEA; Comité Etico de Experimentación Animal sobre el número de protocolo CEEA/069-13). Los ratones Nude (nu/nu), hembras de aproximadamente 4-5 semanas y 18 g de peso, se obtuvieron de granjas Harlan Laboratories, Srl, Italia.

Los ratones se dejan durante 1 semana en el animalario para que se habitúen al nuevo ambiente y, para protegerlos, se mantuvieron en jaulas con presión positiva. Una vez pasada esta semana, se identifican poniéndoles una anilla numerada en una oreja. Se anestesian con una inyección intraperitoneal de una mezcla de ketamina (100 mg/kg) y xilazina (5mg/kg). Se limpia la zona de la operación con una solución de yodo. Se hace una incisión de 2-3 mm a lo largo del lado derecho de la línea media y anterior a la línea interneural, a la altura de los ojos. Esto deja expuestas las suturas coronal y sagital del cráneo. El punto Bregma está posicionado en la unión de estas dos suturas. La entrada del tornillo guía se marca en un punto 2,5 mm a la derecha y 1 mm anterior a la línea Bregma. Este punto está localizado directamente encima del núcleo caudado. A 1x1 mm de profundidad se hace un agujero con un taladro de mano directamente con el tornillo (bolt) estéril a través del cráneo hasta la meninge duramadre. En las siguientes figuras 14, 15 y 16 se representa la zona de inserción del tornillo.

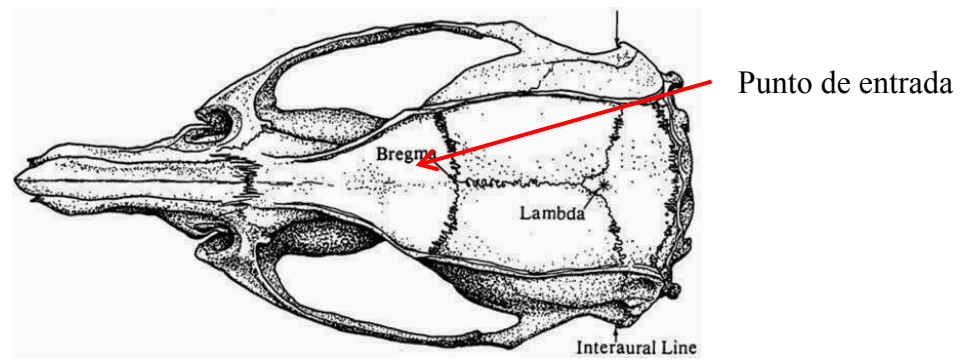


Figura 14. Imagen representativa esquematizada de la posición del punto tornillo en el cráneo del ratón, en el punto Bregma. Imagen obtenida de la página web www.jove.com. En concreto de la referencia Jacqueline F. Donoghue, H Journal of Visualized Experiments, 2011 (Donoghue *et al.*, 2011).

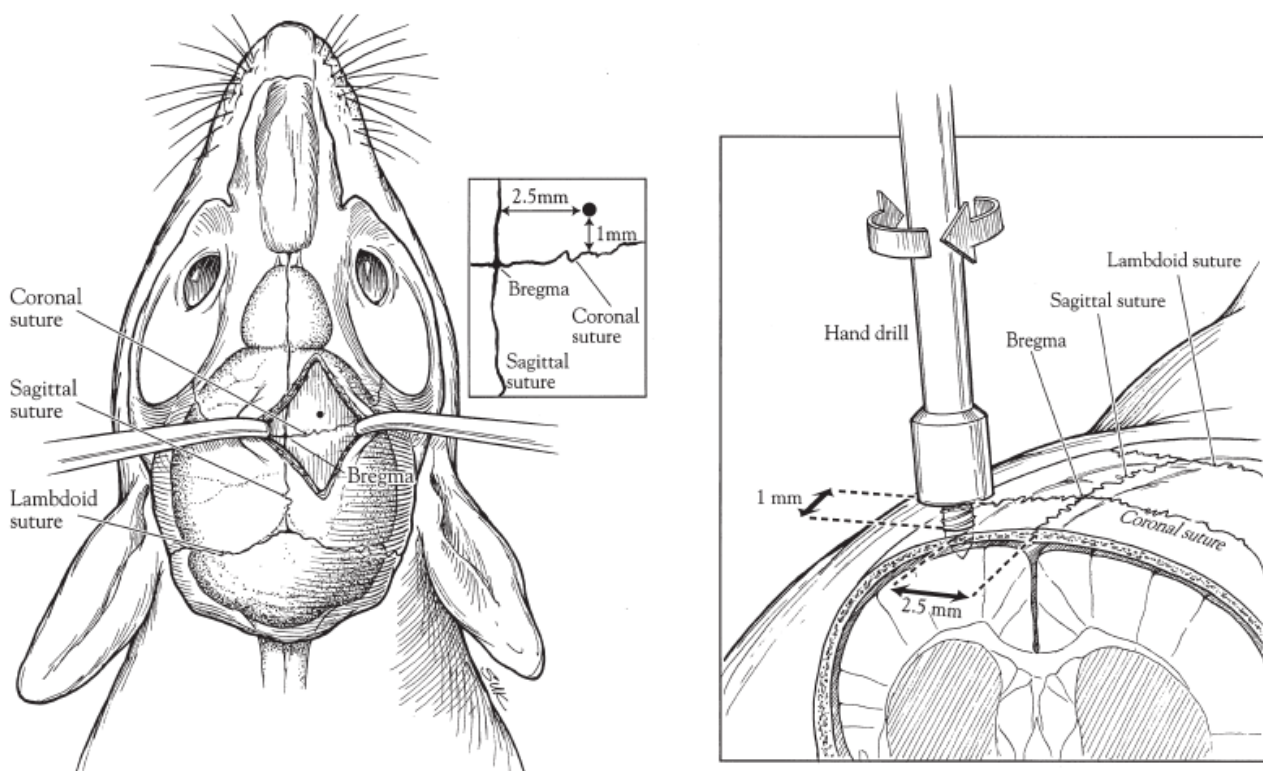


Figura 15. Imagen representativa de la posición del tornillo guía junto con el método de la colocación de éste. Imágen obtenida de Lal. S *et al* (Lal *et al.*, 2000).

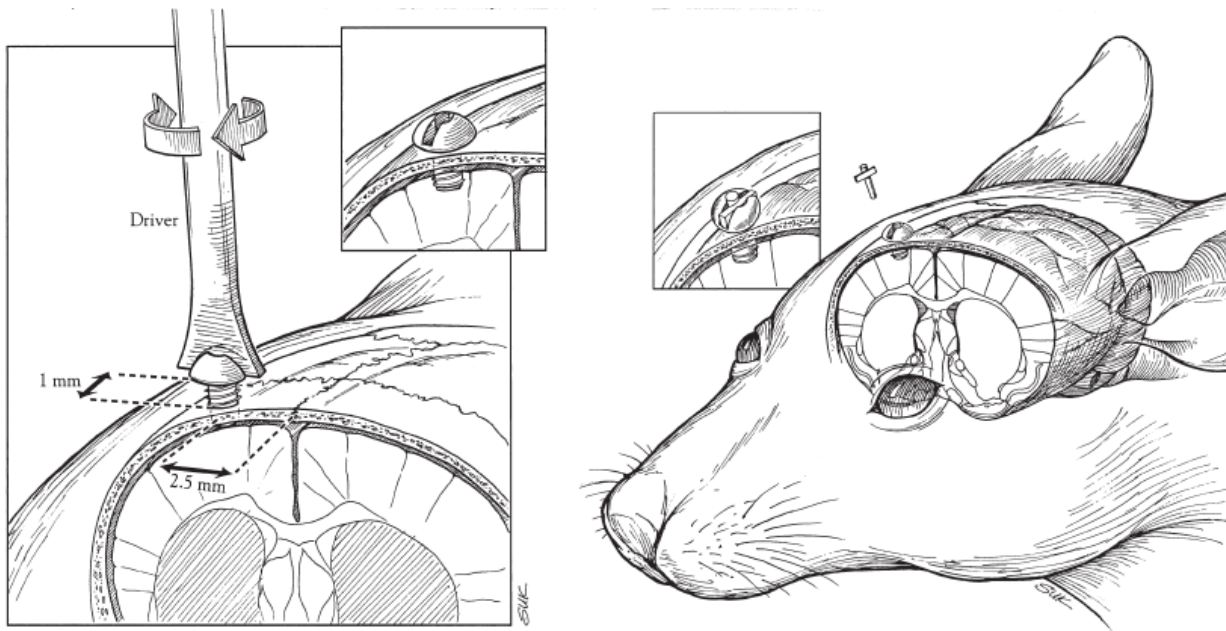


Figura 16. Imagen representativa del método de la colocación del tornillo guía. Imágen obtenida de Lal. S *et al* (Lal *et al.*, 2000).

El tornillo se deja directamente ahí para posteriormente inocular las células en ese punto que sirve de guía (Figura 17). Una vez puesto el tornillo se procede a cerrar la incisión con pegamento quirúrgico y se inyecta analgésico subcutáneamente en el lomo del ratón.



Figura 17. Imagen representativa de la posición del punto tornillo guía en el cráneo del ratón, en el punto Bregma. Imagen obtenida de la página web www.jove.com. En concreto de la referencia Jacqueline F. Donoghue, H Journal of Visualized Experiments, 2011 (Donoghue *et al.*, 2011).

A la semana siguiente a la preparación de los ratones, se inyectaron las células (5×10^5 por ratón y línea celular) de PNETs (PFSK-1 y SK-PN-DW). Por otro lado, se

inyectaron 5×10^5 células de la línea U87 MG a cada ratón y 3×10^5 células de la línea GSC23 por ratón (Figura 18).

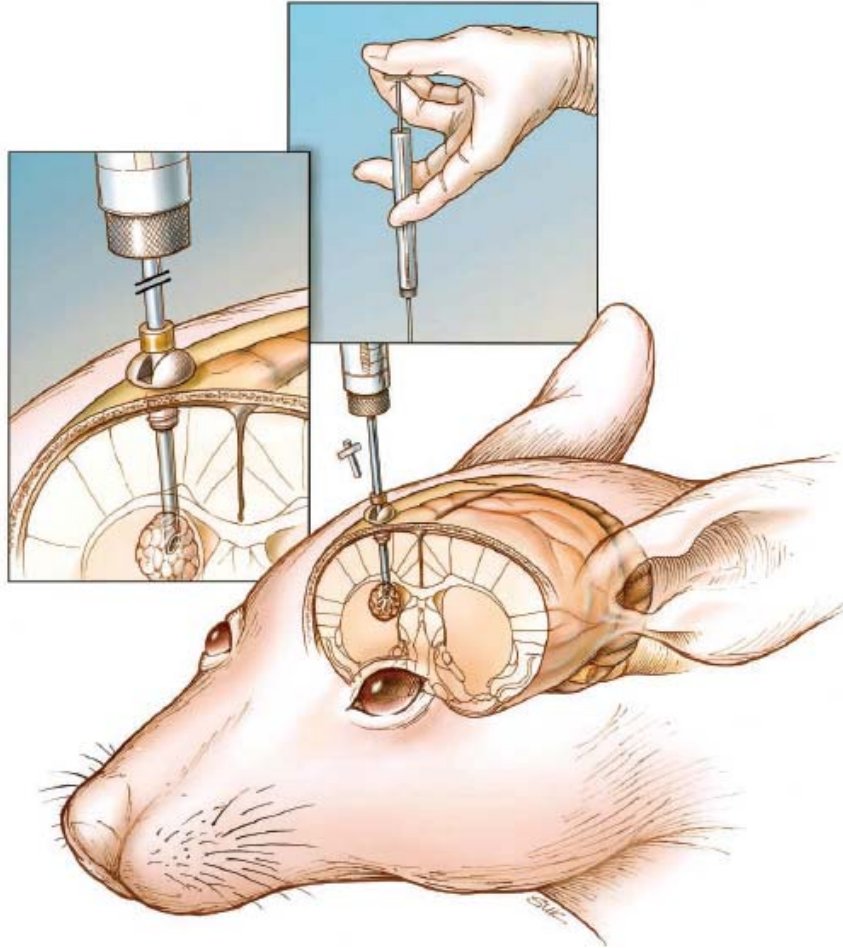


Figura 18. Imagen representativa del modo de la inserción de las células tumorales para generar el tumor cerebral. Imagen obtenida de Lal. S *et al* (Lal *et al.*, 2000).

Se preparó una aguja Hamilton estéril poniéndole un manguito de plástico en la punta, permitiendo que la aguja entrara únicamente 2 mm para salir del tornillo guía (Figura 19). Por tanto, el punto de inoculación fue de 3 mm por debajo de la superficie del cráneo.

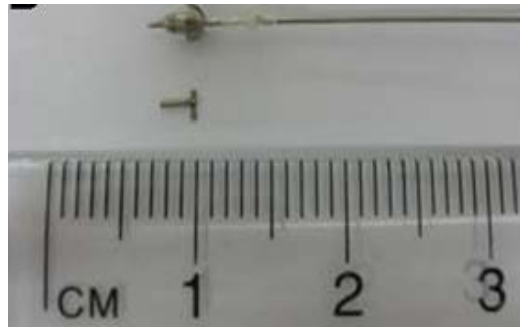


Figura 19. Imagen representativa de la posición del manguito de la aguja Hamilton. Imagen obtenida de la página web www.jove.com. En concreto de la referencia Jacqueline F. Donoghue, H Journal of Visualized Experiments, 2011. (Donoghue *et al.*, 2011).

Los ratones se anestesiaron de la misma forma que cuando se les puso el tornillo guía. Se hizo una pequeña incisión sobre el tornillo. La jeringa Hamilton se llenó con 5 μ l de células, cuidando que no entraran burbujas de aire. La jeringa se fijó a una bomba de perfusión y se insertó en el tornillo guía. Las células que se inocularon funden a continuación, a una velocidad de 30 μ l/h (Figura 20).



Figura 20. Imagen representativa del aparato automatizado en el momento de la inyección de las células tumorales a los ratones. Imagen obtenida de la página web www.jove.com. En concreto de la referencia Jacqueline F. Donoghue, H Journal of Visualized Experiments, 2011. (Donoghue *et al.*, 2011).

El aparato automatizado nos permitió inyectar a 5 animales a la vez, a un caudal constante. Las células también se pueden inyectar manualmente mediante el uso de la jeringa Hamilton con manguito. La inyección debe entonces ser realizada a un ritmo constante. Cuando la infusión es completa, la jeringa es retirada cuidadosamente. La herida se cierra con el pegamento quirúrgico. Se les vuelve a poner analgésico y se deja que se despierten en una manta eléctrica precalentada.

Tres días después de la inoculación de las células, los ratones se anestesiaron de nuevo para hacer una incisión en la zona del tornillo guía siguiendo el mismo proceso ya descrito anteriormente. A un grupo de ratones de la línea PFSK-1 y de la línea SK-PN-DW se inyectaron 5 μ l de PBS como control, otro grupo fue inoculado con 1×10^8 pfu VCN-01/5 μ l/ratón y otro grupo con 1×10^8 pfu Delta-24-RGD/5 μ l/ ratón para cada línea.

En el ensayo de GBM, el primer grupo de ratones de la línea U87 MG y de las neuroesferas GSC23 se le inyectaron 5 μ l de PBS como control. Otro grupo fue inoculado con 5 μ l del virus VCN-01 1×10^8 pfu inactivo con luz UV, el tercer grupo de ratones fue inoculado con 1×10^7 pfu VCN-01 /5 μ l/ratón, y el último grupo fue inoculado con 1×10^8 pfu VCN-01/5 μ l/ratón, para cada línea.

Todos fueron tratados con una inyección intratumoral siguiendo el mismo proceso que al inyectar las células. Al terminar, se cerró la incisión y se puso analgésico con una inyección subcutánea en el lomo del ratón. Se dejó que los ratones despertaran en una manta eléctrica. Se siguió el proceso de supervivencia: si tiemblan, o tienen poco apetito y pierden peso, o no se pueden mover, o no se acicalan o carecen de fuerza o tienen la columna curvada, se sacrifican con CO₂ evitando cualquier sufrimiento al animal y se decapitan obteniendo el cerebro para posteriores análisis.

Todos los estudios en animales se realizaron en las instalaciones de Veterinaria del Centro de Investigación Médica Aplicada, de acuerdo con las normas éticas para la atención de animales de experimentación. Al utilizar virus se trabajó en una cabina de flujo laminar y los animales se mantuvieron en presión positiva.

2.10. Tinción hematoxilina-eosina de los cerebros

Una vez que se sacrificaron los ratones y se les extrajo el cerebro, estos se guardaron en formaldehído durante 48 h para fijar bien el tejido y posteriormente se cambiaron a etanol para eliminar toda el agua del tejido durante al menos 24 h. El formaldehído actúa mediante la formación de puentes entre las moléculas tisulares. Se utiliza a concentraciones próximas al 4%. Actúa como conservante, produce poca retracción

tisular y es compatible con la mayoría de las tinciones histológicas, incluidas las inmunohistoquímicas.

Una vez fijado se cortó cada cerebro de manera transversal dividiendo el tumor en dos y se incluyeron en parafina (Figura 21). La deshidratación se consigue mediante el tratamiento con alcoholes, normalmente etanol, de gradación creciente hasta alcohol de 100°, durante 30 min cada paso (H₂O, etanol 70°, etanol 90°, etanol 96° y etanol 100°). Posteriormente se transfiere el tejido a xileno durante 30 min. El xileno es miscible tanto con el alcohol de 100° como con la parafina. Se denomina sustancia intermedia.

Por último se pasa el tejido a parafina previamente licuada en una estufa regulada a la temperatura apropiada para dicho tipo de parafina. Se realizan tres pasos por parafina líquida para favorecer una completa sustitución del líquido intermedio por la parafina. El tiempo que dura el proceso depende de lo volátil que sea el líquido intermedio y lo grande que sea la pieza. Será mayor cuanto menos volátil es el líquido intermedio o mayor sea la muestra de tejido. Tras la inclusión completa de la muestra se vierte parafina líquida en un molde, se introduce la muestra y se coloca según la orientación deseada de corte y se deja solidificar a temperatura ambiente.

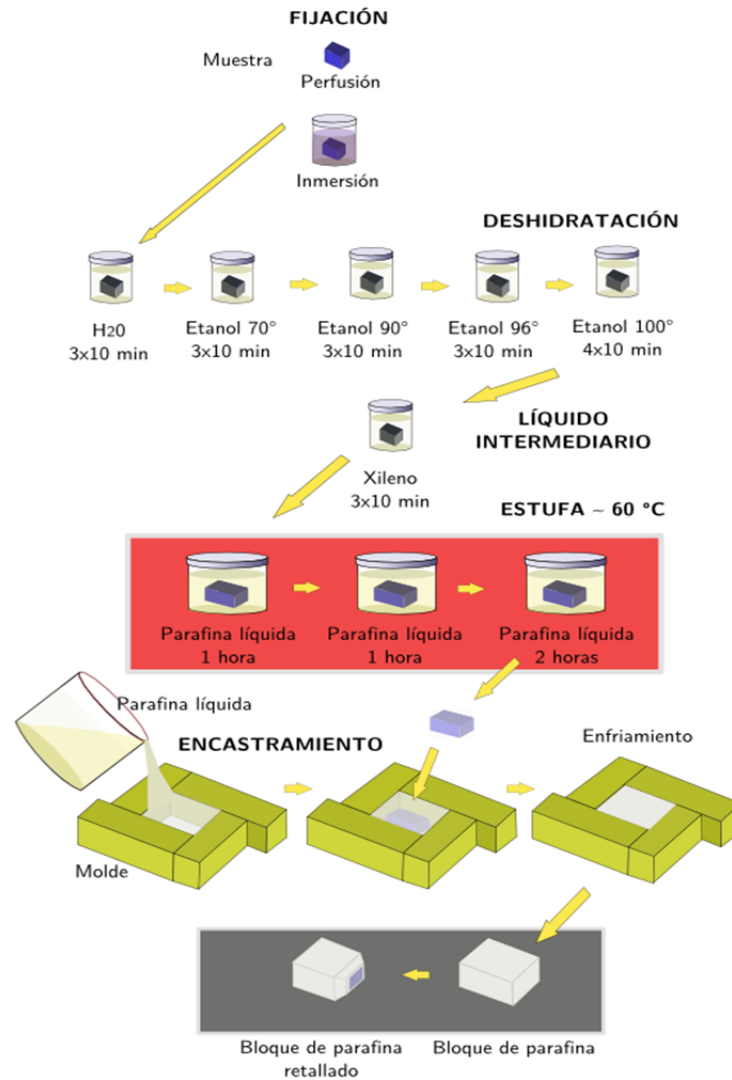


Figura 21. Imagen explicativa del protocolo de la inclusión en parafina de los cerebros. Imagen obtenida de la página web de técnicas histológicas de la Universidad de Vigo.

Una vez que tenemos los bloques de parafina, se realizan los cortes del tejido. Se utilizó un micrótomos que hace secciones de 5 a 20 μm de grosor. Las secciones obtenidas se colocan sobre agua caliente entre 35°C y 40°C, y esta temperatura las hace extenderse sin llegar a su punto de fusión, que está en torno a los 60°C.

La superficie del portaobjetos donde se colocan las tiras de cortes ha de estar previamente tratada para que nuestro tejido quede adherido durante el procesamiento posterior. Para ello, los portaobjetos se recubren con soluciones de gelatina, albúmina u otras sustancias y se dejan secar, de manera que hacen de adhesivo entre el cristal y nuestro tejido.

Una vez que el agua se ha evaporado y están extendidas las tiras de cortes de parafina sobre el portaobjetos, se procede a un secado exhaustivo en una estufa a una temperatura de entre 35°C y 40°C durante toda la noche. Una vez secos, los portaobjetos con las secciones están listos para el procesamiento posterior.

Comenzamos con la tinción de hematoxilina-eosina. El proceso de tinción se detalla a continuación:

1. Se parte de muestras que se han cortado en secciones de unas 8 μm y adheridas a portaobjetos recubiertos con gelatina.
2. 2x10 min en xileno para desparafinar.
3. 2x10 min en etanol 100°.
4. 10 min en etanol 96°.
5. 10 min en etanol 80°.
6. 10 min en etanol 50°.
7. 5 min en H₂O destilada.
8. 5-10 min en Hematoxilina de Harris.
9. 15 min en agua corriente. Diferenciación.
10. 2x5 min en H₂O destilada.
11. 0,5 a 2 min en Eosina al 2%. La eosina, colorante ácido, se une a elementos del citoplasma y de la matriz extracelular. Se pueden usar tres tipos de eosina: eosina amarillenta (CI 45380), eosina azulada (CI 45400) y eosina soluble en alcohol (CI 45386). La primera es la más usada.
12. Tiempo variable en 70° para diferenciación. El tiempo de diferenciación depende de la intensidad de tinción de eosina que queramos en nuestra muestra.
13. 5 min en etanol 96°.
14. 2x10 min en etanol 100°.
15. 2x10 min en xileno.
16. Montado con medio de montaje.

Las fotos de los cortes de cerebro de la tinción de hematoxilina-eosina se hicieron en un microscopio microautomatizado.

2.11. Análisis inmunohistoquímico

La inmunohistoquímica es una técnica para la localización de moléculas en los tejidos mediante el empleo de anticuerpos (proteínas del tipo inmunoglobulina G). Se basa en la gran especificidad y alta afinidad que tienen los anticuerpos para reconocer a moléculas y unirse a ellas. Además, la conjugación o combinación de los anticuerpos con enzimas o con sustancias fluorescentes permite detectar cantidades ínfimas de moléculas presentes en el tejido.

Por tanto, además de obtener secciones de los bloques de parafina de los cerebros de los ratones para la tinción con hematoxilina-eosina, también se obtuvieron secciones para ser tratadas con el anticuerpo obtenido en cabra anti-Hexón (Chemicon, CA, EE.UU) y el anticuerpo policlonal obtenido en oveja anti-ácido hialurónico (Abcam, Cambridge, Reino Unido). Se obtuvieron de la misma manera que en el proceso descrito anteriormente. Se detalla a continuación, los pasos posteriores a la desparafinación e hidratación de los bloques de parafina:

Primero se desparafinaron e hidrataron las secciones de 5 a 20 μm de grosor. Posteriormente se realizó una recuperación antigénica con Tris-EDTA (10-1 mM, pH 9) a 95°C durante 30 min. Una vez recuperados los antígenos, se bloquearon las secciones con peroxidasa endógena, 3% H_2O_2 en H_2O durante 12 min a temperatura ambiente. Los posibles errores en el proceso de inmunodetección incluyen la presencia de la actividad de la peroxidasa en el tejido, dando lugar a inmunorreactividad de fondo o incluso falsos positivos. Por ello, se debe bloquear la actividad de la peroxidasa mediante peróxido de hidrógeno. También se bloqueó con biotina endógena. Para ello se utilizó biotina y avidina, 10 min cada una (kit Dako, X0590). La biotina endógena también puede dar origen a falsos positivos, por lo que también es necesario el bloqueo. Una vez bloqueadas las secciones, se incubaron con el anticuerpo anti-hexón (Millipore, AB1056) 1:2000, para todos los ratones y con el anticuerpo anti-ácido hialurónico (AB53842) 1:800, sólo para los ratones de las líneas celulares U87 MG y GSC23, ambos a 4°C toda la noche (Figura 22).

La proteína Hexón es una proteína asociada a la cápside de los adenovirus. Se añadió el anticuerpo de Hexón para comprobar si los virus estaban localizados únicamente en el tumor y si su replicación perduró hasta la desaparición del tumor. Para detectar la unión

del anticuerpo anti-Hexón, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario, obtenido en conejo, anti-goat biotinado 1:200, durante 30 min a temperatura ambiente (kit Dako, E0466). Como el anticuerpo secundario estaba biotinado, se añadió Estreptavidina-HRP (Vector, SA5004) 1:200, durante 30 min a temperatura ambiente. Por tanto, éste se unió a los anticuerpos conjugados a biotina. Finalmente, se añadió DAB (diamino-bencidina) (kit Dako, K3868), que reacciona con HRP dando un cambio de color en las zonas donde se encuentra Hexón. Para destacar Hexón, se contrastó ligeramente con hematoxilina de Harris, después se deshidrató y se montaron las preparaciones de las secciones.

El ácido hialurónico se expresa en gran cantidad en la matriz extracelular. Como el adenovirus VCN-01 expresa la hialuronidasa PH20, la expresión de este ácido debe encontrarse en el mismo lugar dónde actúa el virus VCN-01. Para detectarlo se incubaron las secciones con el anticuerpo obtenido en conejo, anti-goat biotinado 1:200, durante 30 min a temperatura ambiente (kit Dako, E0466). Como el anticuerpo secundario estaba biotinado, se añadió Estreptavidina-HRP (Vector, SA5004) 1:200, durante 30 min a temperatura ambiente. Por tanto, éste se unió a los anticuerpos conjugados a biotina. Finalmente, se añadió DAB (diamino-bencidina) (kit Dako, K3868), que reacciona con HRP dando un cambio de color en las zonas donde se encuentra el ácido hialurónico. Para destacar el ácido hialurónico, se contrastó ligeramente con hematoxilina de Harris, después se deshidrató y se montaron las preparaciones de las secciones.

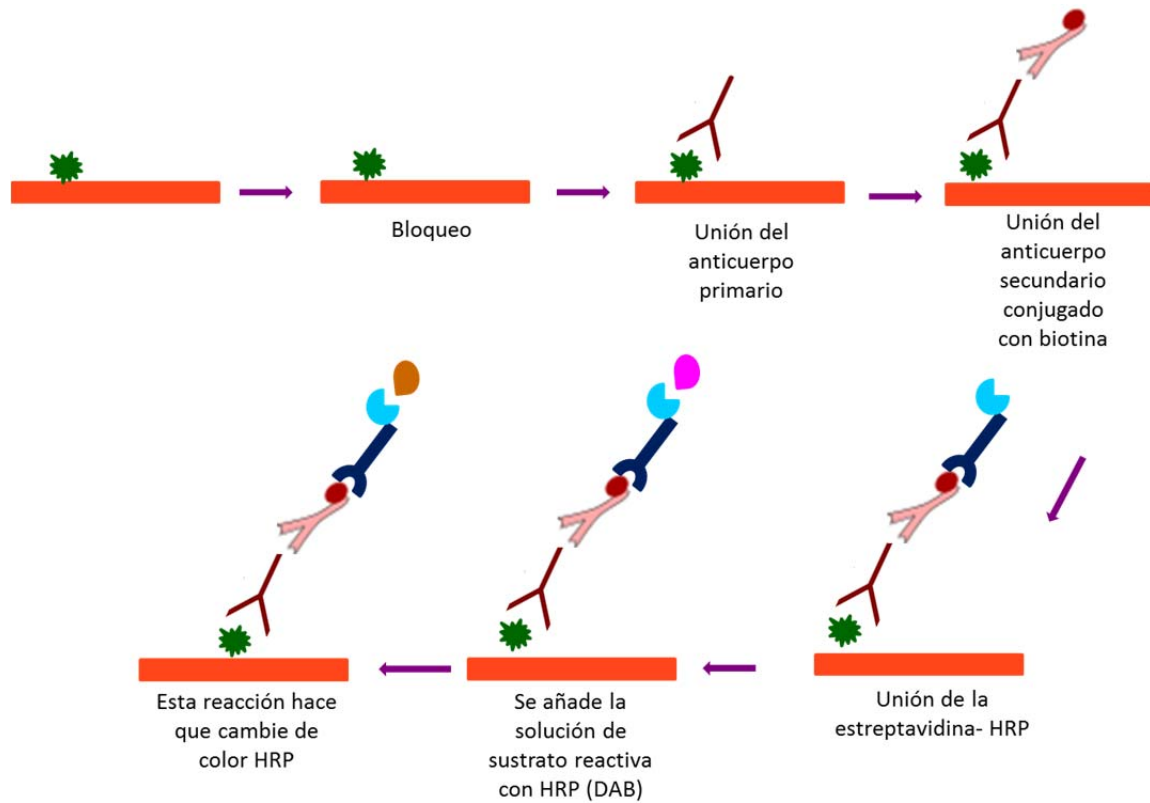


Figura 22. Imagen explicativa del protocolo de la inmunohistoquímica de Hexón y el ácido hialurónico.

Las fotos de los cortes de cerebro del análisis inmunohistoquímico se hicieron en un microscopio microautomatizado.

2.12. Análisis estadístico

Los experimentos *in vitro* fueron analizados mediante el análisis estadístico *t-Student* de dos colas. Los datos se expresan con la media y la desviación estándar. El efecto citopático *in vivo* del adenovirus VCN-01 y del adenovirus Delta-24-RGD en los xenoinjertos de glioblastomas y PNETs humanos fue evaluado a través de la curvas de supervivencia según el método de Kaplan-Meier, no paramétrico de la función de supervivencia. Además, la supervivencia de los distintos grupos fue comparada usando el test long-rank.

Resultados

RESULTADOS

1. PNETs

1.1. Análisis de la expresión de los receptores celulares para el adenovirus (CAR e integrinas $\alpha\beta 3$ y $\alpha\beta 5$) en las células establecidas de PNETs.

Para determinar la posible susceptibilidad de las líneas de PNETs (PFSK-1 y SK-PN-DW) a la infección con los adenovirus Delta-24-RGD y VCN-01 analizamos la expresión de los receptores CAR, integrinas $\alpha\beta 3$ y $\alpha\beta 5$ en la membrana de estas células mediante citometría de flujo. A continuación, se presentan las gráficas en las que se puede comprobar que en la línea PFSK-1 la expresión de CAR es inferior a la expresión de la Integrina $\alpha\beta 5$. Este dato sugiere que la infectividad sería alta en estas células a pesar de que la Integrina $\alpha\beta 3$ es inferior a la expresión de CAR. Sin embargo, en la línea SK-PN-DW la expresión de las integrinas $\alpha\beta 3$ y $\alpha\beta 5$ es inferior a la expresión de CAR (Figura 23).

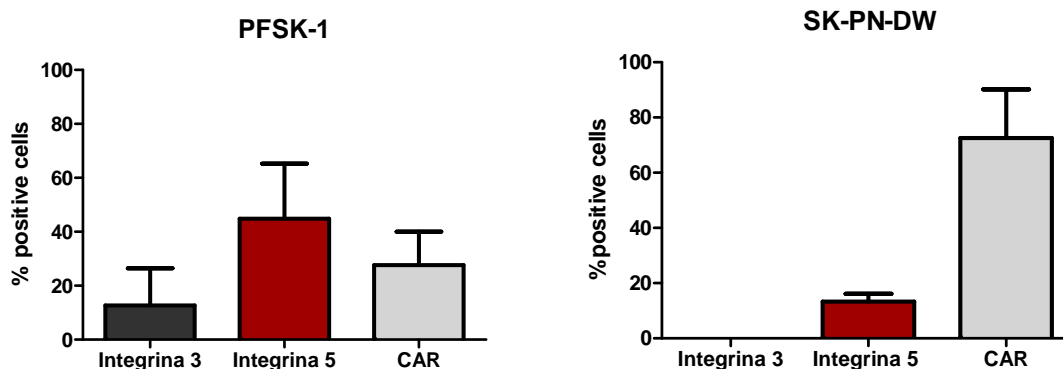


Figura 23. Expresión de los receptores CAR, Integrina $\alpha\beta 3$ e Integrina $\alpha\beta 5$ en líneas celulares de PNETs. La expresión de los receptores en ambas líneas se corresponde con el porcentaje de infectividad de los virus Delta-24-RGD y VCN-01 en dichas líneas celulares.

Por otro lado, comprobamos el porcentaje de infectividad en estas líneas con el adenovirus GFP-RGD. El porcentaje de infectividad a la dosis de 100 MOIs fue mayor en la línea PFSK-1 que en la SK-PN-DW (Figura 24). La infectividad en la línea SK-PN-DW es similar con ambas dosis de infección (10 MOIs y 100 MOIs). Estos

resultados indican que ambas células son susceptibles a la infección con adenovirus dirigidos a infectar a través de las integrinas.

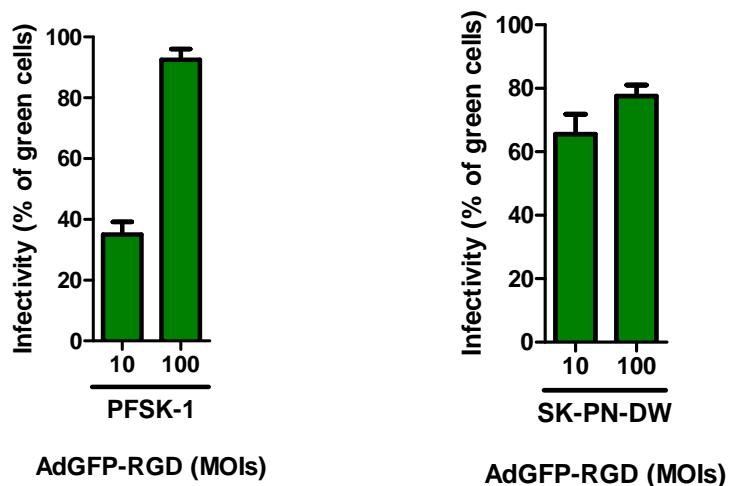


Figura 24. Análisis del porcentaje de infectividad de las líneas celulares de PNETs mediante el adenovirus GFP-RGD. El porcentaje de infectividad es mayor en la línea PFSK-1 que en la línea SK-PN-DW. La infección a 100 MoIs es más elevada en la línea PFSK-1 y la diferencia respecto a la infección con 10 MoIs es más notable en la línea PFSK-1 que en la línea SK-PN-DW.

1.2. Delta-24-RGD y VCN-01 se replican eficientemente en líneas celulares establecidas de PNETs *in vitro*.

Para estudiar el comportamiento de los dos virus en las líneas celulares de PNETs, analizamos la expresión de las proteínas víricas tempranas y tardías.

Por un lado, la proteína E1A es una proteína crucial que se expresa inmediatamente después de la infección e inicia el ciclo de replicación del virus (Gubbay *et al.*, 1990). Se encarga de la activación de la transcripción genética vírica, se une al supresor del crecimiento celular, altera el crecimiento celular e inhibe la activación de elementos de respuesta por la vía de interferón. Además, tiene un peso de 48 kDa, pero presenta muchas bandas en los resultados del *Western blot*, ya que es una proteína que se caracteriza por presentar splicing alternativo. Por otro lado, la Fibra es una proteína de la cápside que se expresa más tarde en el ciclo y tiene un peso de 62 kDa. Por consiguiente, la Fibra se expresará cuando el virus esté formado. Como control de carga utilizamos la proteína GBR2 de 25 kDa, que produce una banda bien distanciada de las

de las otras dos proteínas. En consecuencia, si detectamos expresión de las dos proteínas, se sugiere una replicación viral efectiva.

Las dos líneas celulares, PFSK-1 y SK-PN-DW, fueron infectadas con 1 MOI y 10 MOIs del virus VCN-01 cada una y con 5, 10, 50 y 100 MOIs del virus Delta-24-RGD. A las 48 h de haber sido infectadas, se evaluó la expresión de las proteínas E1A y Fibra mediante *Western blot*. Se observó un buen nivel de expresión, dosis dependiente, de ambas proteínas en ambas líneas celulares, tanto con el adenovirus Delta-24-RGD como con el adenovirus VCN-01 (Figura 25).

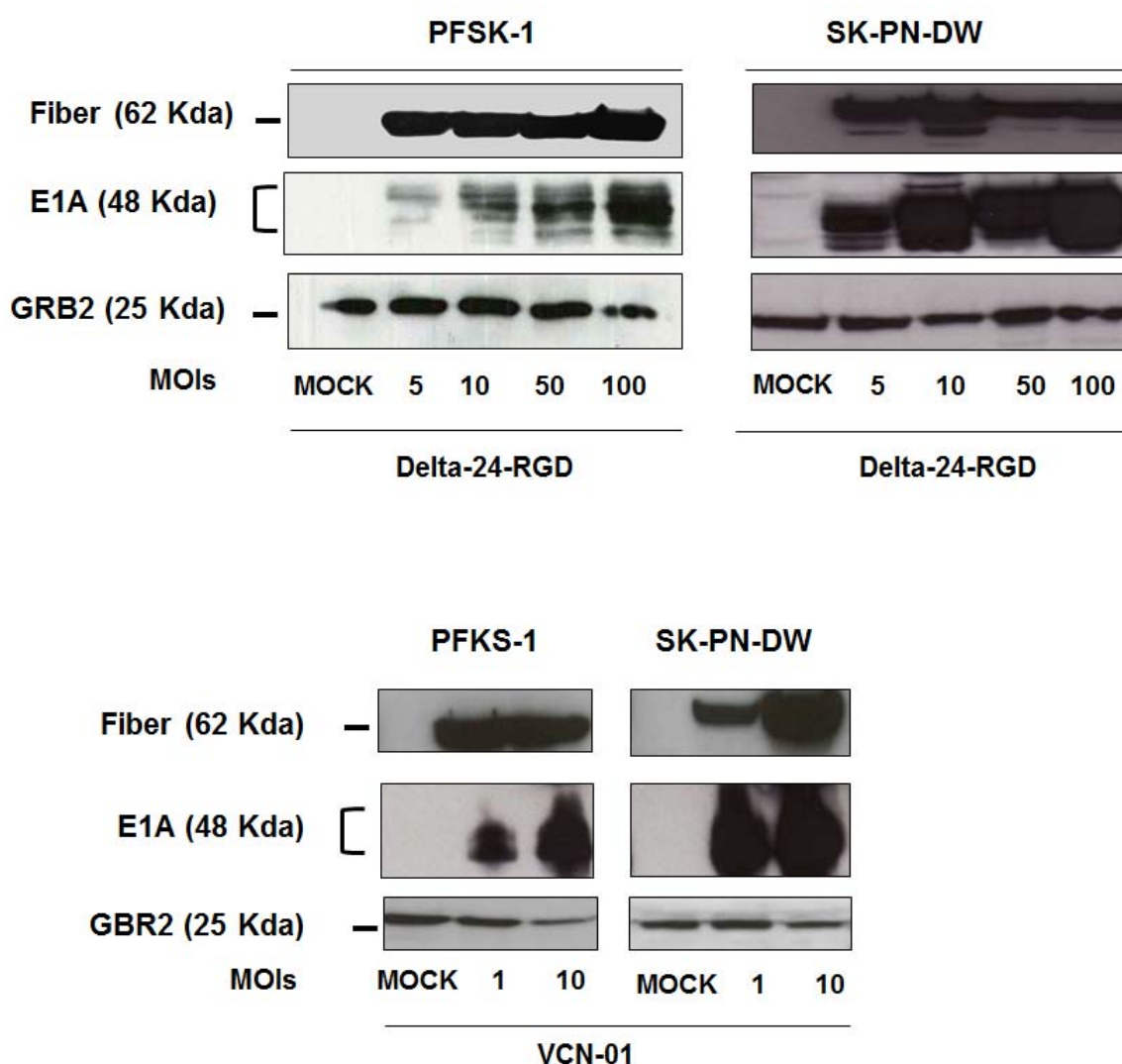


Figura 25. El virus Delta-24-RGD y el virus VCN-01 se replican eficientemente en las líneas celulares de PNETs humanas *in vitro*. La expresión de proteínas Fibra y E1A en PNETs se determinaron por análisis de *Western blot*. El nivel de ambas proteínas es dosis-dependiente en las dos líneas celulares.

Por otro lado, el virus VCN-01 expresa la enzima hialuronidasa PH20, que se analizó mediante la cuantificación de su ARN mensajero una vez que el virus ha infectado las distintas líneas celulares de PNETs. Comprobamos cómo su expresión fue constante y dosis dependiente. Además, analizamos si existe una correlación entre la expresión de Fibra y la de hialuronidasa PH20. La expresión del ARN mensajero de la hialuronidasa PH20 se correlaciona con la expresión de la Fibra, sugiriendo una similar cinética (Figura 26).

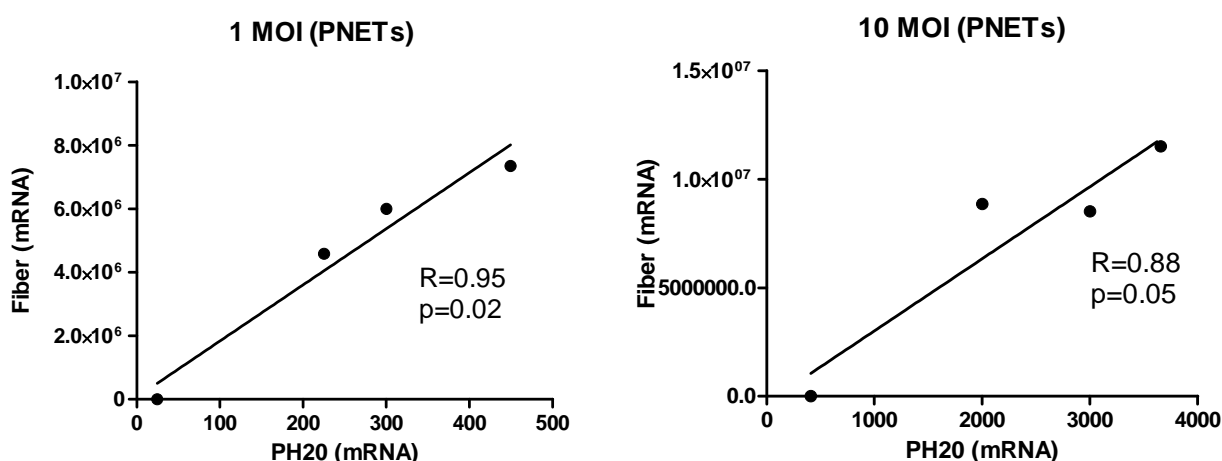


Figura 26. VCN-01 se replica eficientemente en las líneas celulares de PNETs humanas *in vitro*. La expresión del ARN mensajero de Fibra y PH20 fue determinada mediante PCR a tiempo real. Se demostró correlación en la expresión de ambos genes.

Tanto en la dosis de 1 MOI como en la dosis de 10 MOIs obtuvimos una $R^2=0,95$ y 0.88, respectivamente. Además la p de significación es $p=0,02$ y $p=0,05$ respectivamente. Esto sugiere que a ambas dosis de la enzima PH20 y la Fibra siguen un mismo patrón de expresión.

Finalmente, para analizar cómo se comporta el virus en las líneas celulares de PNETs, cuantificamos la replicación viral del virus VCN-01 comparándolo con el virus Delta-24-RGD. Ambas líneas fueron infectadas con 10 MOIs por duplicado. Uno de los test utilizados sirvió como control de las células a las 12h post-infección. En las células infectadas con el virus VCN-01 se compararon dos MOIs diferentes, 1 MOI y 10 MOIs (Figura 27).

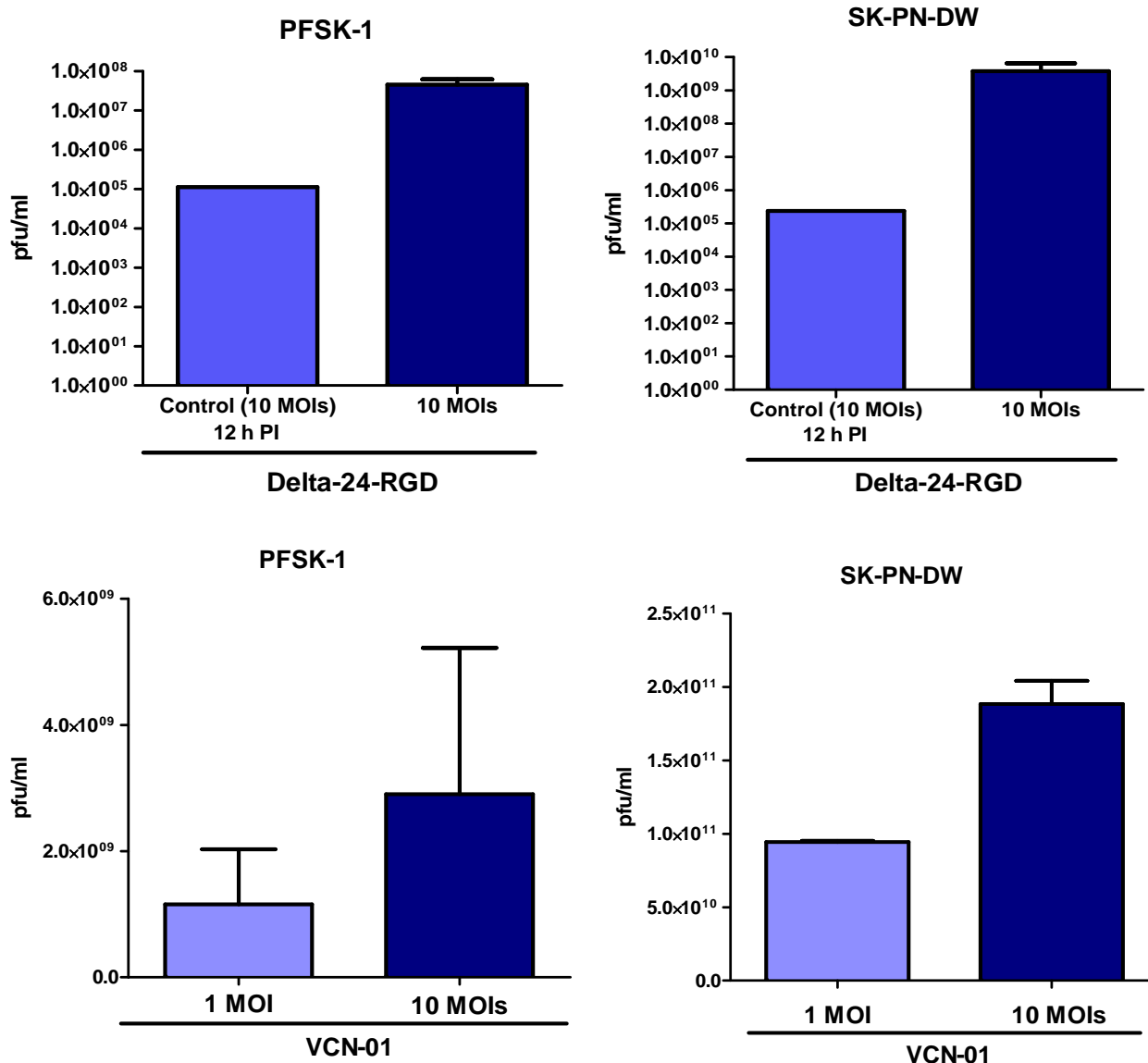


Figura 27. VCN-01 se replica eficientemente en las líneas celulares de PNETs *in vitro*. Cuantificación del virus VCN-01 en la replicación viral en las dos líneas celulares. El virus se replica mejor en las líneas celulares que fueron infectadas con 10 MOIs y esto demuestra que el virus infecta y se replica eficientemente en las líneas celulares de PNETs *in vitro* mejor que el virus D24-RGD. Las líneas celulares de PNETs humanas fueron infectadas con dos diluciones del virus VCN-01 (1 MOI y 10 MOIs).

Los controles 12h post-infección (PI) del virus Delta-24-RGD, se utilizaron para comprobar que el virus se replica eficientemente. Pudimos confirmar que el virus Delta-24-RGD y el virus VCN-01 se replican eficientemente en ambas líneas celulares. Pero, tal y como esperábamos, el virus VCN-01, tanto con 10 MOIs como con 1 MOI, se replica 1 logaritmo mejor que el virus Delta-24-RGD a 10 MOIs.

1.3. El adenovirus VCN-01 ejerce un potente efecto antitumoral en líneas celulares establecidas de PNETs.

Para examinar el efecto antitumoral que ejercen los adenovirus Delta-24-RGD y VCN-01 en las líneas celulares establecidas de PNETs (PFSK-1 y SK-PN-DW), realizamos ensayos de viabilidad celular utilizando MTT.

Como ya se ha explicado anteriormente en el apartado 2 de Material y Métodos, evaluamos la IC50 mediante quintuplicados de cada dosis y realizándose cada ensayo por triplicado. Observamos que todas las líneas celulares fueron susceptibles tanto al virus oncolítico Delta-24-RGD como al virus VCN-01. El virus VCN-01 ejerció un potente efecto antitumoral *in vitro*, mayor en las líneas celulares establecidas que el causado por el virus Delta-24-RGD (Figura 28). A continuación, se desglosan las IC50 de las líneas tratadas con el virus VCN-01 (Tabla 7).

Tabla 7. IC50 de las líneas celulares de PNETs estudiadas. Los datos se expresan media y desviación estándar.

LÍNEA CELULAR	VIRUS Delta-24-RGD IC50 ± SD (MOIs)	VIRUS VCN-01 IC50 ± SD (MOIs)
PFSK-1	13,026 ± 2,1	9,77 ± 1,7
SK-PN-DW	17,635 ± 3,4	7,45 ± 0,9

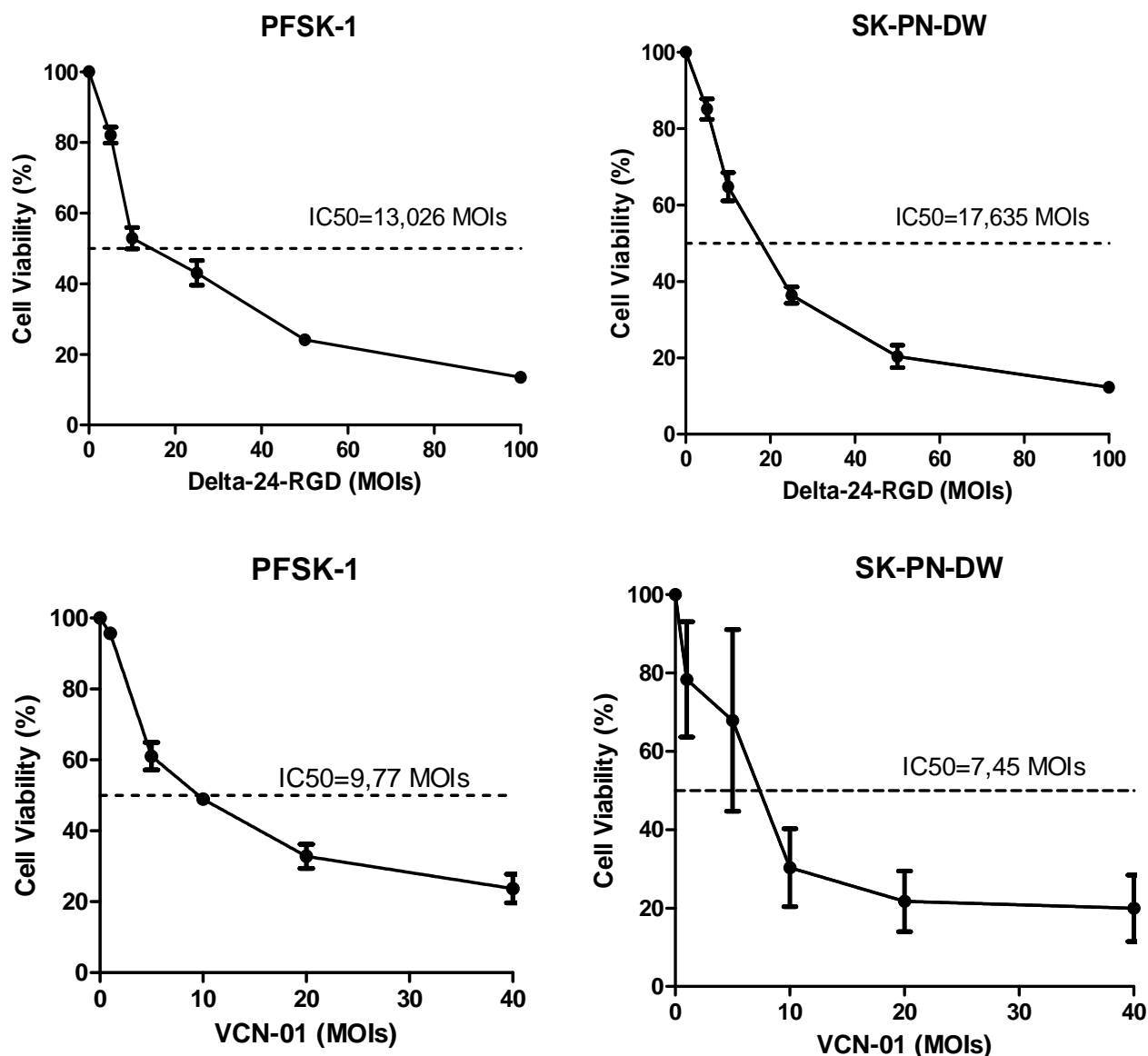


Figura 28. VCN-01 ejerce un potente efecto antitumoral en las líneas celulares de PNETs. El análisis de la viabilidad celular fue evaluado usando MTT [3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazolio Bromuro], 5 días después de la infección con VCN-01 y con D24-RGD. Los datos se expresan como media y desviación estándar de las células vivas después de la infección con el virus VCN-01 y con el virus D24-RGD con las diferentes MOIs con respecto a las células infectadas con ambos virus inactivados con luz ultravioleta (control, equivalente a 100 %).

1.4. El tratamiento con VCN-01 resultó en un efecto antitumoral significativo en dos modelos de PNETs *in vivo*.

Después de los óptimos resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*, evaluamos la eficacia antitumoral de los virus Delta-24-RGD y VCN-01 *in vivo* utilizando las dos

líneas anteriores de PNETs. Ambos modelos de PNETs son bien conocidos y óptimos para la representación de estos tumores en ratones y la obtención de resultados fiables.

El modelo de la línea celular de PFSK-1 ofrece una buena representación de estos tumores, ya que estas células son capaces de multiplicarse indefinidamente y diferenciarse a cualquier tipo de célula y tienen una intensidad heterogénea con pequeñas áreas de necrosis. En algunos casos se encuentran calcificaciones y generalmente estos tumores tienen fronteras mal definidas y formas irregulares (Tan, *et al.*, 2014).

El segundo modelo corresponde a la línea celular SK-PN-DW, que se parece a células madre tumorales, ya que crece como las neuroesferas de GBM, *in vitro*. Esta línea procede de tejido embrionario retroperitoneal neoplásico, y también da lugar a tumores neuroectodérmicos primitivos que se caracterizan porque son más agresivos que los PNETs que provienen de células neuroepiteliales, como la línea PFSK-1. Por ello, son tumores más cercanos a la realidad. Estos tumores son muy densos, con muchas células nucleadas, están bien delimitados y poseen gran capacidad de proliferación, lo que explica el rápido crecimiento de los mismos. Presentan muchas áreas hemorrágicas. El estudio microscópico muestra abundantes células con citoplasmas grandes y núcleos muy marcados, mitosis, áreas de necrosis y proliferación vascular con hiperplasia endotelial.

A ambos modelos, PFSK-1 y SK-PN-DW, *in vivo*, se les administró el virus Delta-24-RGD y el virus VCN-01 siguiendo el patrón de administración ya explicado anteriormente (ver material y métodos). Al grupo control se le administró PBS, vehículo en el cual se administran los virus. Esto evita los errores de diferencias debidas al vehículo la técnica quirúrgica. Al segundo grupo se le administró VCN-01 (1×10^8 pfu/ratón; N=10) y al tercer grupo se le administró Delta-24-RGD (1×10^8 pfu/ratón; N=10). El virus fue inyectado en un volumen final de 5 μ l.

Para el modelo con la línea PFSK-1, la media de supervivencia del grupo control fue de 12 días. La media de supervivencia del grupo que recibió el virus VCN-01 1×10^8 pfu/ratón, fue de 19 días y la media de supervivencia del grupo que recibió el virus Delta-24-RGD 1×10^8 pfu/ratón fue de 22 días (Figura 29). La supervivencia para el modelo de la línea celular PFSK-1 resultó significativa ($p=0,0096$).

Para el modelo de la línea SK-PN-DW, la media de supervivencia fue de 14 días. La media de supervivencia para el grupo que recibió el virus VCN-01 1×10^7 pfu/ratón, fue de 35 días y hubo un ratón que sobrevivió más de 90 días (Figura 29). Además, la media de supervivencia del grupo que fue tratado con el virus Delta-24-RGD 1×10^8 pfu/ratón fue de 24 días (Figura 29). La supervivencia para el modelo de la línea celular SK-PN-DW resultó significativa ($p=0,0002$).

La supervivencia obtenida en los ratones del modelo de la línea celular SK-PN-DW, fue parecida a la obtenida en el modelo de la línea celular PFSK-1. La diferencia se mostró en que hubo un ratón del grupo VCN-01 que sobrevivió más de 90 días. Por tanto, podemos decir que efectivamente el virus VCN-01 es un buen candidato para el estudio de tratamientos alternativos contra los tumores cerebrales.

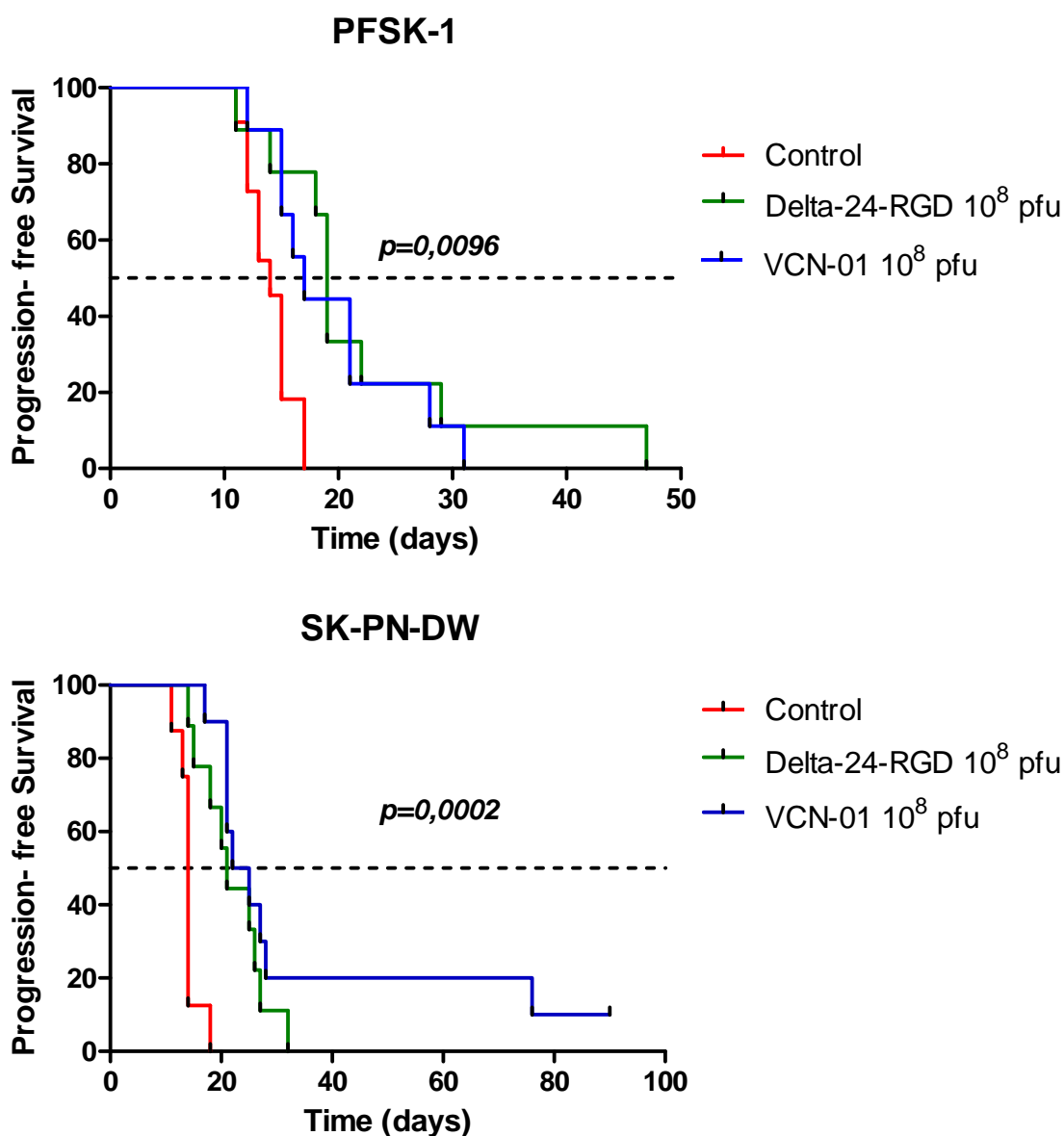


Figura 29. El tratamiento con Delta-24-RGD y VCN-01 produjo un significativo efecto antitumoral en dos modelos de PNETs *in vivo*. Se representan las curvas de Kaplan-Meier para expresar la supervivencia global de los grupos tratados con el virus Delta-24-RGD (10^8 pfu), VCN-01 (10^8 pfu), y control (PBS) de los ratones con los xenoinjertos intracraneales de PFSK-1 y SK-PN-DW. La implantación intracraneal de las células PFSK-1 y SK-PN-DW se consideró el día 0, y fue seguida de una inyección a los 3 días de Delta-24-RGD (10^8 pfu; $n = 10$), VCN-01 (10^8 pfu; $n = 10$), o PBS (control; $n = 10$). Los valores de p fueron determinados con el test long-Rank y representan una comparación de la supervivencia de los ratones tratados con Delta-24-RGD, VCN-01 y PBS.

Una vez concluido el ensayo, se procedió a la extracción de los cerebros de los ratones de ambos modelos y de todos los grupos para realizar el estudio anatomopatológico. Se comprobó que las muestras del grupo control del modelo de PFSK-1 tenían tumores bastante definidos con mucha vascularización, tal y como se muestra en las imágenes de hematoxilina-eosina (Figura 30). No se detectó proteína Hexón en este grupo. Esto

señala que el ensayo se ha realizado correctamente, ya que muestran el tumor pero no el virus, como era de esperar (Figura 30). Las imágenes escogidas han sido las más representativas de los tumores de este grupo.

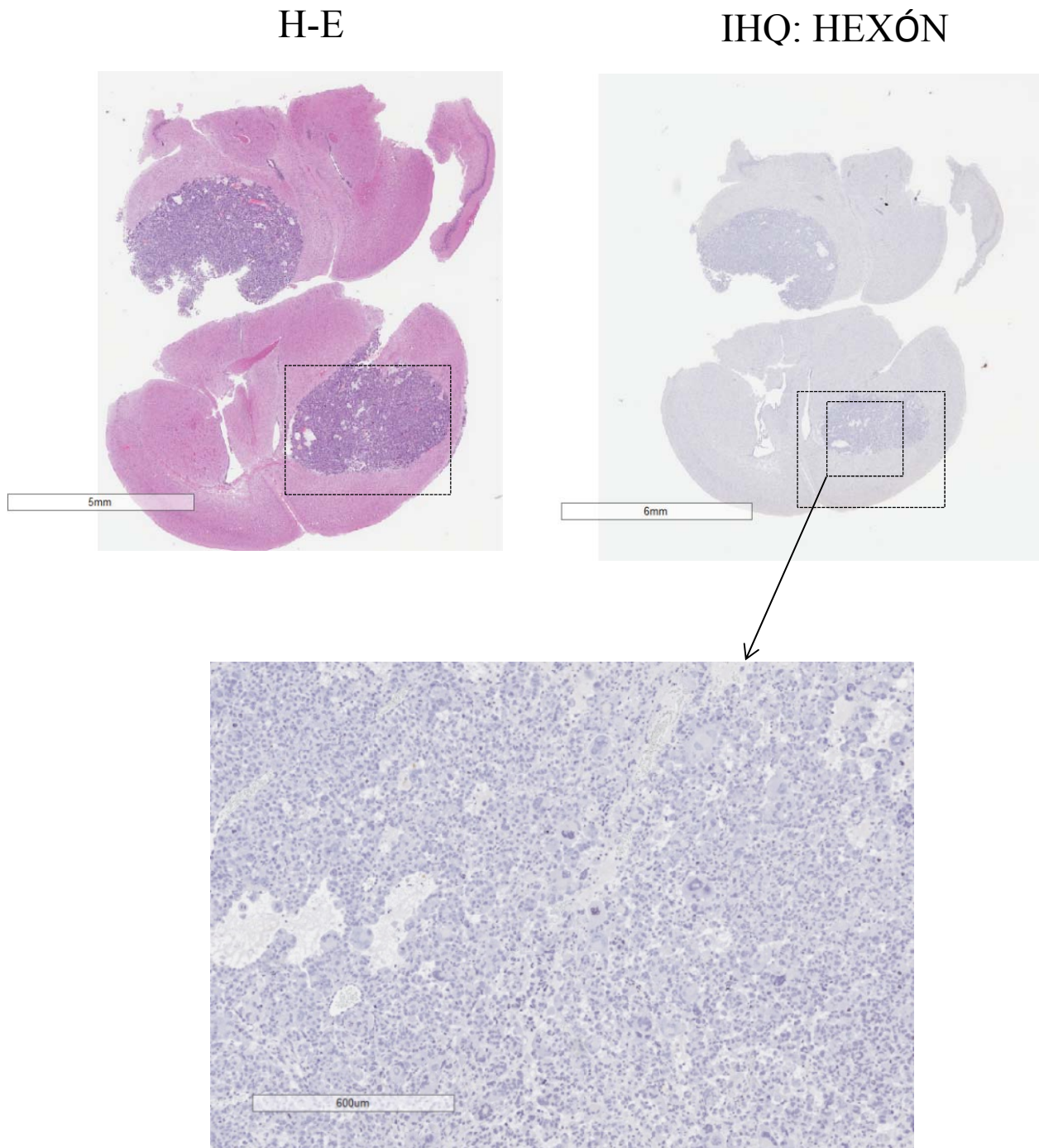
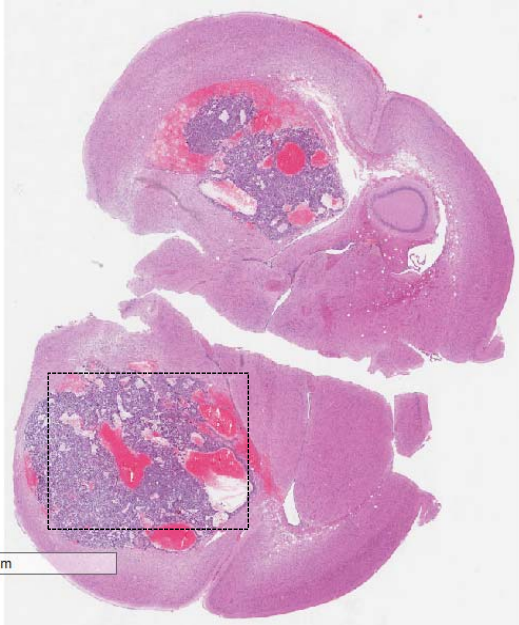


Figura 30. La línea celular PFSK-1 crea tumores bien definidos y delimitados. Hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica de Hexón en los tumores de los ratones tratados con PBS. Las secciones fueron incubadas con el anticuerpo anti- Hexón. No se detecta expresión de Hexón. Aumento de 600 µm.

Los cerebros de los ratones tratados, tanto con VCN-01 (10^8 pfu) como con Delta-24-RGD (10^8 pfu), mostraron las proteínas virales en la zona del tumor. Esto sugiere que ambos virus no solo han infectado sino que también se están replicando. Además, los cerebros de los ratones tratados con VCN-01 muestran más zonas necróticas que los tumores tratados con Delta-24-RGD alrededor de la presencia de las prominentes inclusiones virales, indicando que el virus VCN-01 consigue una mayor difusión que el virus Delta-24-RGD debido a la hialuronidasa PH-20 (Figuras 31 y 32). Las imágenes escogidas han sido las más representativas de los tumores de los grupos tratados con Delta-24-RGD y VCN-01.

H-E



IHQ: HEXÓN

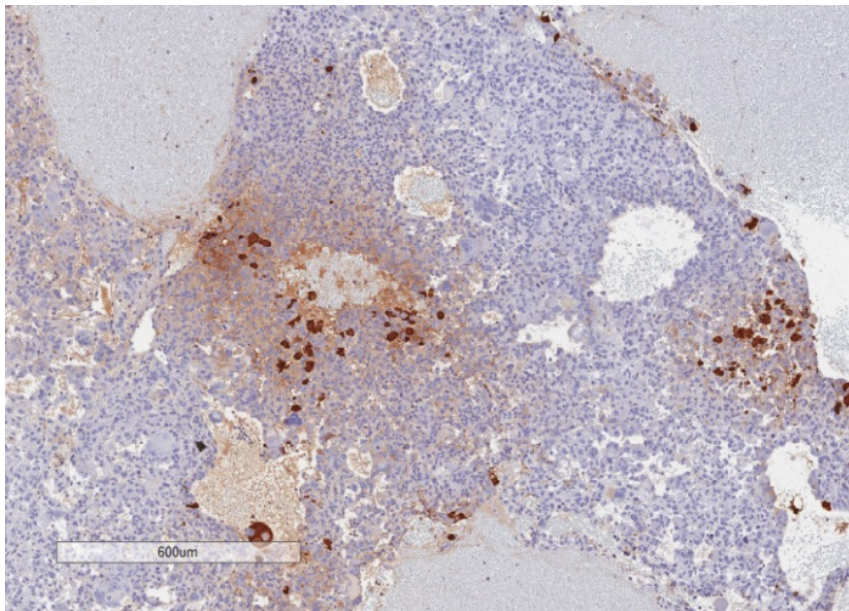
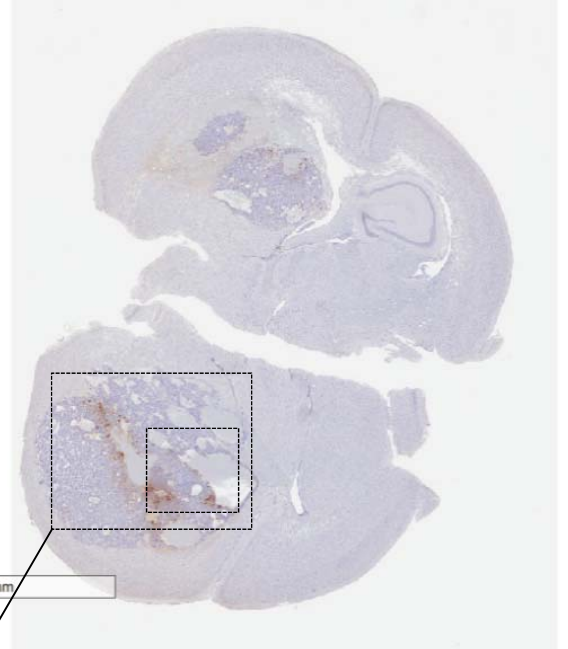


Figura 31. El tratamiento con Delta-24-RGD produjo un significativo efecto antitumoral en la línea celular PFSK-1. Hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica de Hexón en los tumores de los ratones tratados con Delta-24-RGD. Las secciones fueron incubadas con el anticuerpo anti- Hexón. Se detectó expresión de Hexón. El aumento es 600 µm.

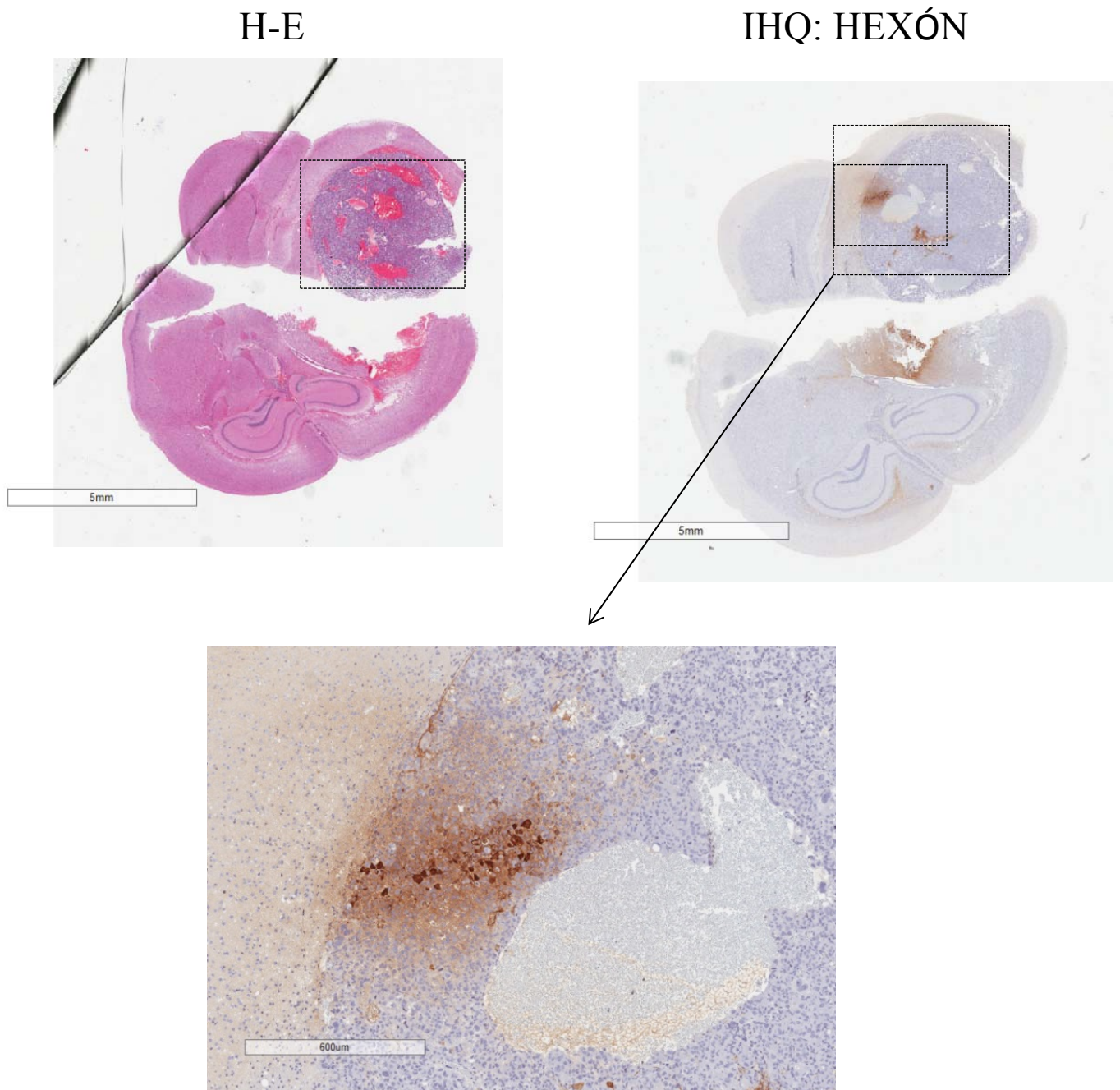


Figura 32. El tratamiento con VCN-01 produjo un significativo efecto antitumoral en la línea celular PFSK-1. Hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica de Hexón en los tumores de los ratones tratados con VCN-01. Las secciones fueron incubadas con el anticuerpo anti- Hexón. Se detectó la expresión de Hexón. El aumento es 600 µm.

Respecto al grupo control del modelo de SK-PN-DW, los ratones produjeron tumores muy celulares y con muchos vasos sanguíneos (Figura 33). Esta línea es mucho más agresiva que la PFSK-1, tal vez debido a que crece mucho más rápido porque sus células se dividen más rápidamente, produciendo un gran número de células en el tumor. Analizando nuevamente los cerebros del grupo control del modelo de SK-PN-DW, presentaron tumor y no se detectó proteína Hexón en este grupo. Las imágenes escogidas han sido las más representativas de los tumores de este grupo.

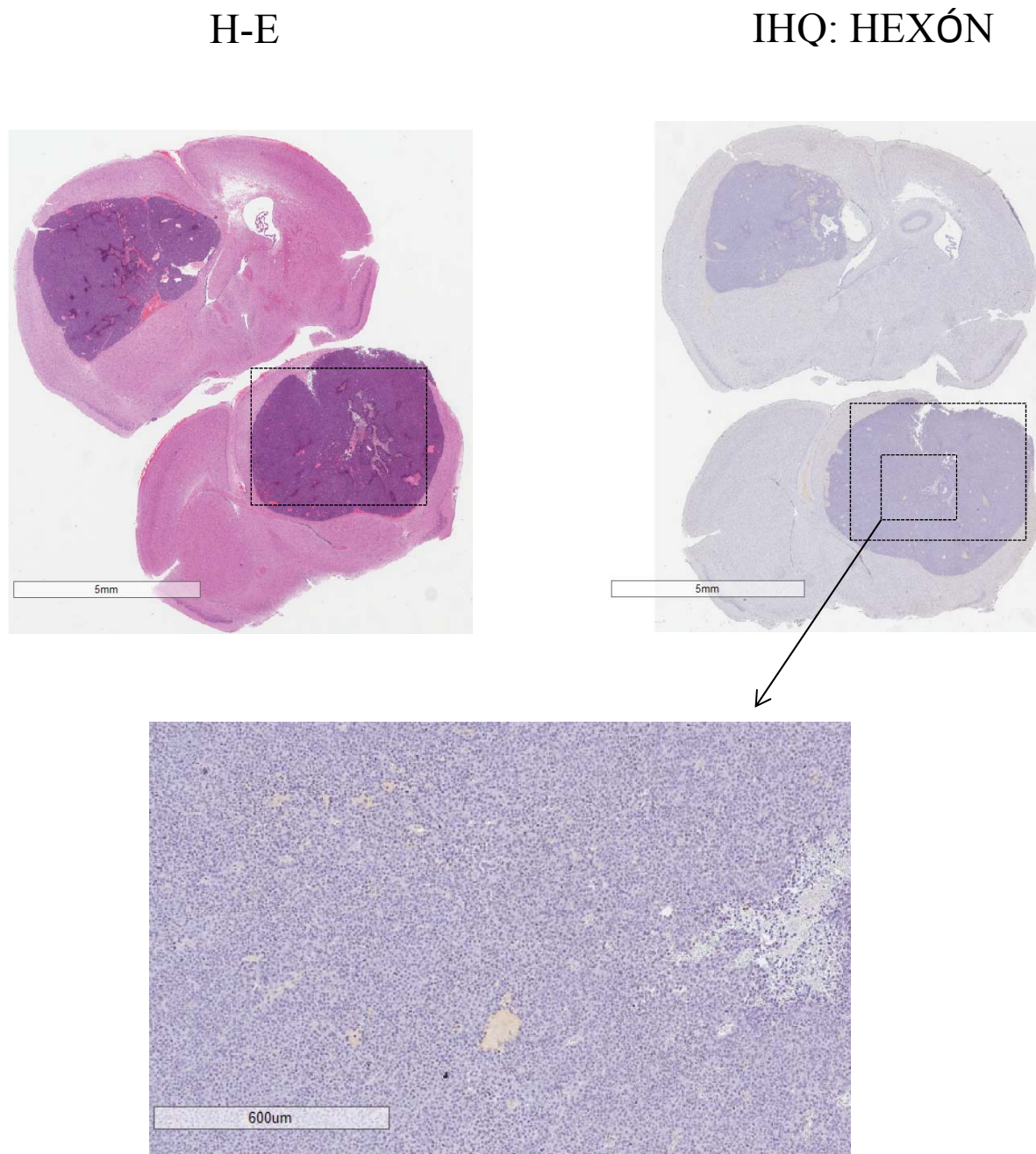


Figura 33. La línea celular SK-PN-DW crea tumores más densos. Hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica de Hexón de los tumores de los ratones tratados con PBS. Las secciones fueron incubadas con el anticuerpo anti- Hexón. No hay presencia de Hexón. El aumento es 600 µm.

Los cerebros de los ratones tratados tanto con VCN-01 (10^8 pfu) como con Delta-24-RGD (10^8 pfu) de SK-PN-DW, también mostraron las proteínas virales en la zona del tumor. Por tanto, consideramos que el virus se replica después de haber infectado a la célula tumoral. Los cerebros tratados con VCN-01 muestran más partículas virales, ya que la expresión de la hialuronidasa PH20 le permite difundirse más en el tumor. También, se puede ver que hay más células necróticas tras el avance del virus VCN-01. Además, hubo un ratón superviviente de largo tiempo que no presentó tumor. En este caso, no se detectó Hexón, lo que confirma que el virus permanece vivo mientras siga habiendo tumor y sólo infecta a las células tumorales (Figuras 34, 35 y 36). Las imágenes escogidas han sido las más representativas de los tumores de los grupos tratados con Delta-24-RGD y VCN-01.

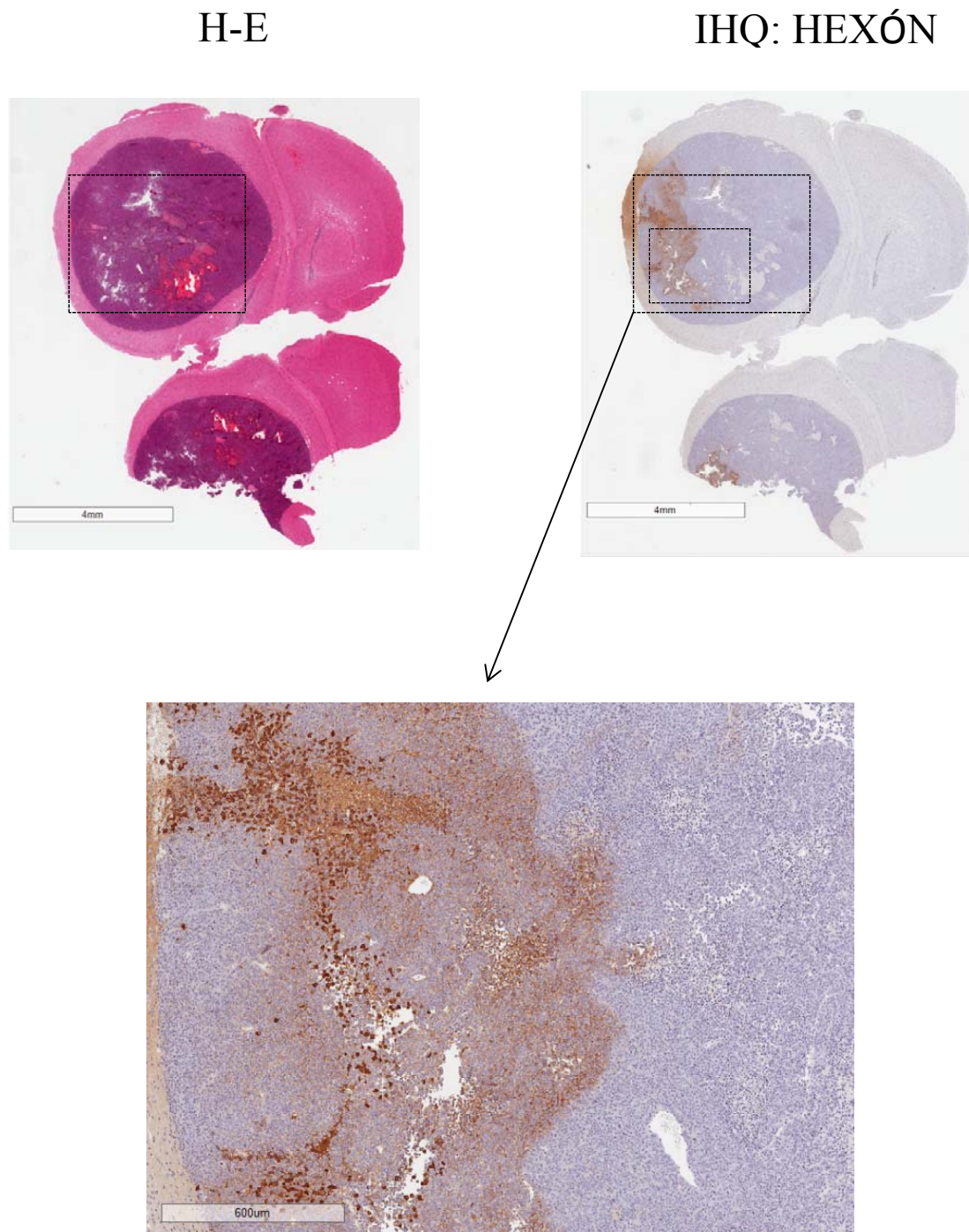
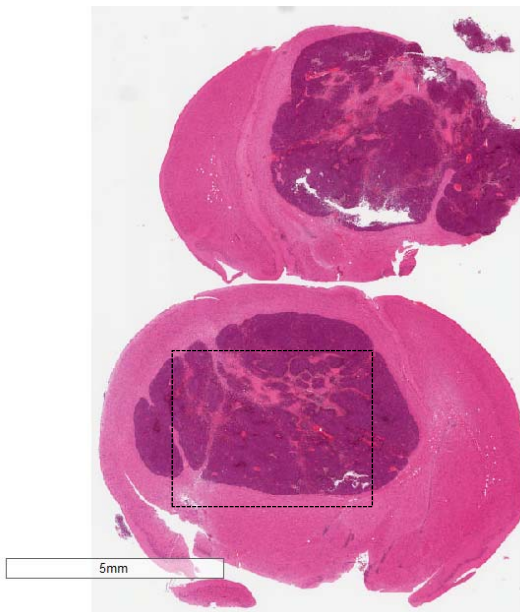


Figura 34. El tratamiento con Delta-24-RGD produjo un significativo efecto antitumoral en la línea celular SK-PN-DW. Hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica de Hexón de los tumores de los ratones tratados con Delta-24-RGD. Las secciones fueron incubadas con el anticuerpo anti-Hexón. Se detecta expresión de Hexón. El aumento es 600 µm.

H-E



IHQ: HEXÓN

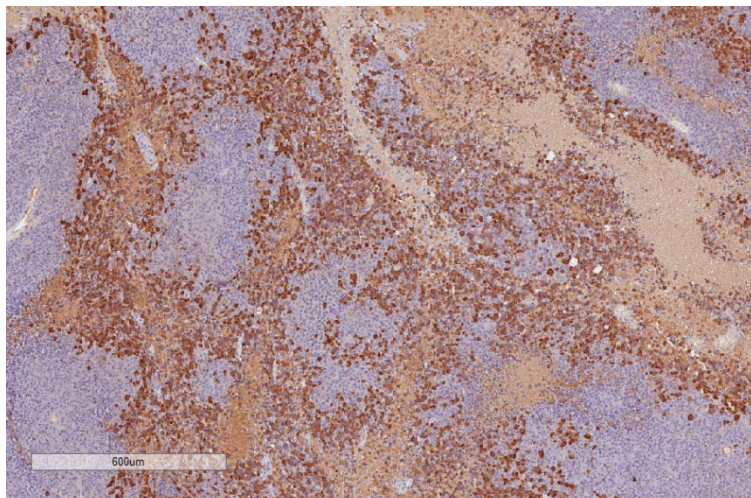
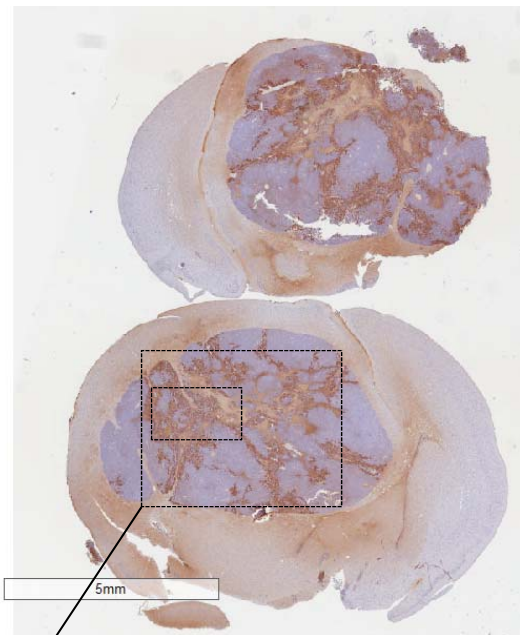


Figura 35. El tratamiento con VCN-01 produjo un significativo efecto antitumoral en la línea celular SK-PN-DW. Hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica de Hexón en los tumores de los ratones tratados con VCN-01. Las secciones fueron incubadas con el anticuerpo anti-Hexón. Se detecta la expresión de Hexón. El aumento es 600 μ m.

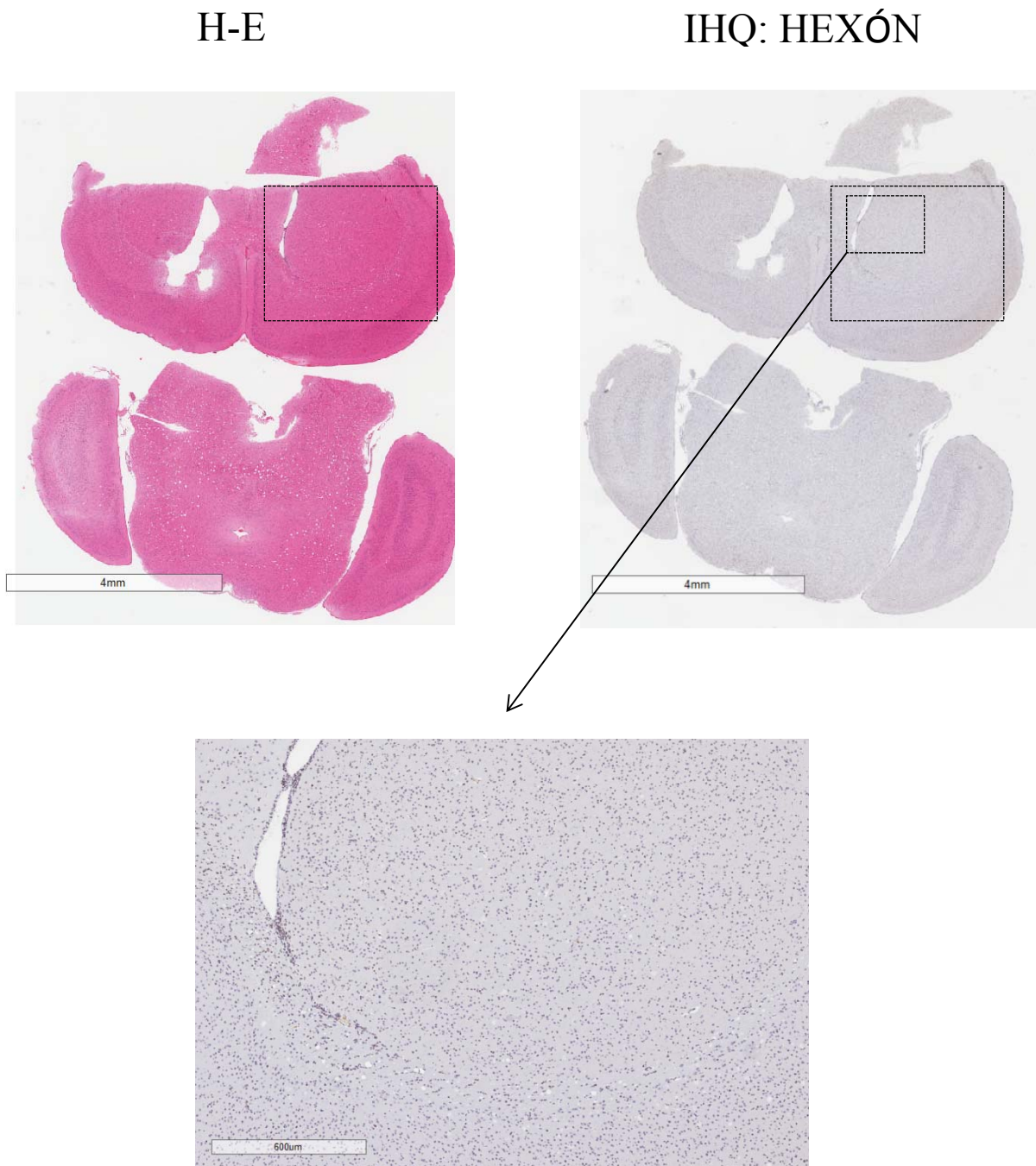


Figura 36. El tratamiento con VCN-01 produjo un significativo efecto antitumoral en la línea celular SK-PN-DW. Hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica de Hexón de los tumores de los ratones tratados con VCN-01. Las secciones fueron incubadas con el anticuerpo anti-Hexón. En este caso el virus consiguió matar todas las células tumorales y el ratón no desarrolló tumor. Por ello, no hay presencia de Hexón. El aumento es 600 µm.

Por tanto, los resultados en ambos modelos de ratones, *in vivo*, modelo de PFSK-1 y modelo de SK-PN-DW, son muy positivos y dejan la puerta abierta a ensayos posteriores. Se observó que el virus VCN-01 tiene un efecto antitumoral mayor que el

virus Delta-24-RGD, por lo que sería el mejor candidato para el tratamiento de los tumores cerebrales.

2. GLIOBLASTOMA MULTIFORME

2.1. El adenovirus VCN-01 ejerce un potente efecto antitumoral en líneas celulares establecidas y células madre tumorales de GBM *in vitro*.

Al comprobar que el adenovirus VCN-01 es más potente que el adenovirus Delta-24-RGD decidimos continuar nuestros estudios en gliomas de adultos únicamente con el virus VCN-01. Se estudió el efecto antitumoral que ejerce este adenovirus en las líneas celulares establecidas de GBM humanas (A172, U373 MG, U251 MG, T98G, SNB19, y U87 MG), en la línea celular establecida de glioma murino (GL261) y en las neuroesferas, células madre tumorales (GSC11 y GSC23) (Figura 37). Evaluamos la IC50 mediante quintuplicados de cada dosis y realizándose cada ensayo por triplicado. Observamos que todas las líneas celulares fueron susceptibles al virus oncolítico VCN-01. La línea más sensible fue U87 MG, obteniendo una $IC_{50}=0,88\pm 0,12$ MOIs, y la más resistente fue la célula madre tumoral GSC23, obteniendo una $IC_{50}=213\pm 18$ MOIs. El resto de las líneas celulares obtuvieron una IC50 diferente, y presentaron distintos grados de resistencia al virus. Además, se puede afirmar que la línea celular GL261 tiene una resistencia elevada a este virus con una $IC_{50}=87,17\pm 11,25$ MOIs (Tabla 8).

Tabla 8. IC50 de las líneas celulares de glioma estudiadas tratadas con el adenovirus VCN-01. Los datos son mostrados con la media y la desviación estándar.

LÍNEA CELULAR	IC50 ± SD (MOIs)
U87 MG	0,88 ± 0,12
SNB 19	2,88 ± 0,25
T98G	72,77 ± 10,8
A172	9,85 ± 2,11
U251 MG	8,17 ± 1,82
U373 MG	1,44 ± 0,33
GSC11	63,75 ± 5,77
GSC23	213 ± 18
GL261	87,17± 11,25

Se representan las gráficas de los triplicados de los ensayos de viabilidad de las líneas celulares tumorales, en las que se muestran, tanto la IC50 como la respuesta dosis dependiente a la concentración del virus (Figura 37 y 38). VCN-01 ejerció un potente efecto antitumoral *in vitro* en las líneas celulares establecidas y en las células madre tumorales.

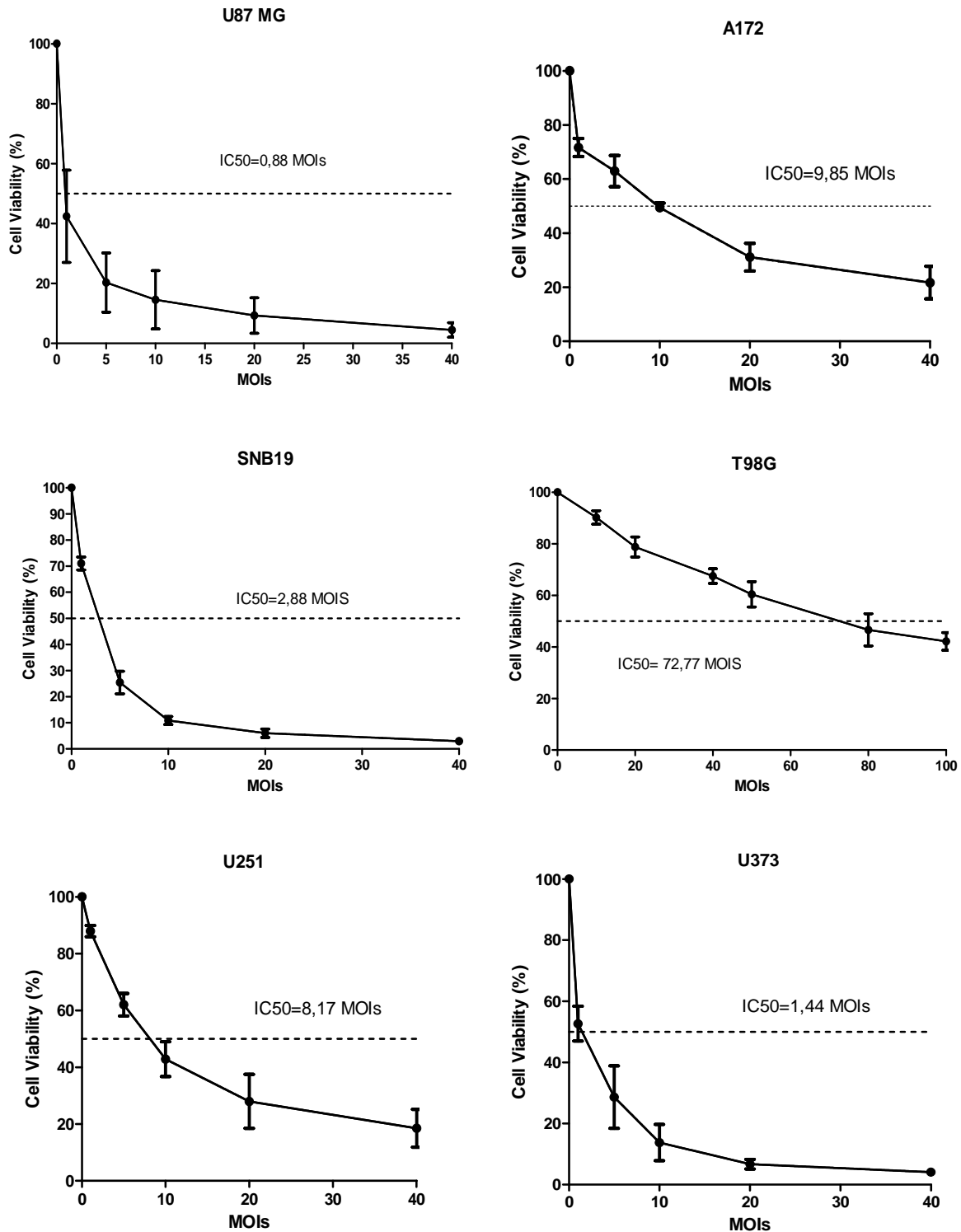


Figura 37. VCN-01 ejerce un potente efecto antitumoral en las líneas celulares establecidas de GBM. El análisis de la viabilidad celular fue evaluado usando MTT [3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazolio Bromuro], 5 días después de la infección con VCN-01. Los datos son mostrados con la media y la desviación estándar de las células vivas después de la infección con el virus VCN-01 con las diferentes MOIs con respecto a las células infectadas con el adenovirus VCN-01 inactivado con luz ultravioleta (control, equivalente a 100 %).

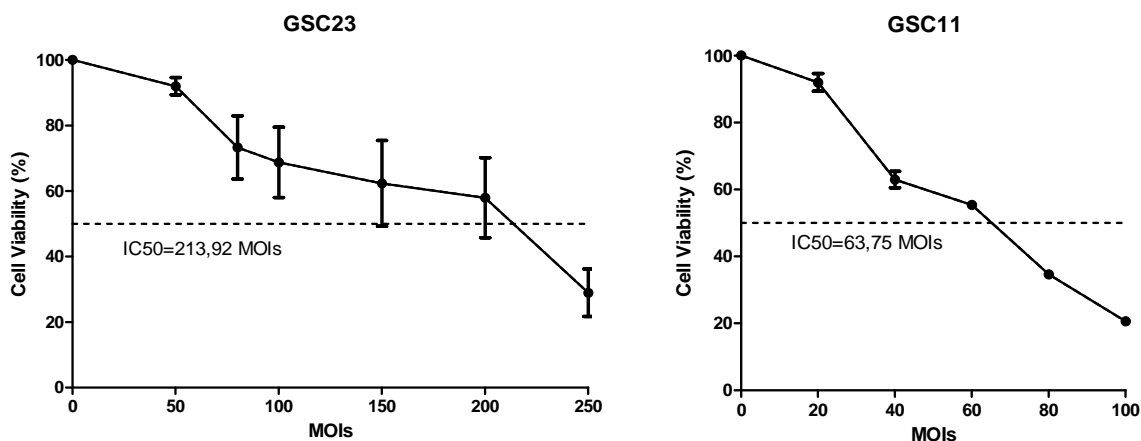


Figura 38. VCN-01 ejerce un potente efecto antitumoral en las células madre tumorales de GBM. El análisis de la viabilidad celular fue evaluado usando MTT [3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazolio Bromuro], 5 días después de la infección con VCN-01. Los datos son mostrados con la media y la desviación estándar de las células vivas después de la infección con el virus VCN-01 con las diferentes MOIs con respecto a las células infectadas con el adenovirus VCN-01 inactivado con luz ultravioleta (control, equivalente a 100 %).

Al ser líneas celulares con distintas características genéticas y fenotípicas, estos ensayos dan una idea de la sensibilidad de estos tumores cerebrales que se generan a través de dichas células. Como se puede comprobar, estas líneas celulares son, en general, sensibles al virus ejerciendo un efecto antitumoral muy importante, incluso en la línea celular GL261, línea de GBM de ratón (Figura 39). Por tanto, es un resultado muy positivo para posteriores ensayos, incluso en los ensayos *in vivo*. Sin embargo, las neuroesferas de GBM, son más resistentes al virus como era de esperar. Son células madre tumorales, indiferenciadas y no especializadas, se dividen y renuevan continuamente. A pesar de ello, el virus fue capaz de conseguir una inhibición del 50% de las células a unas MOIs fácilmente obtenibles.

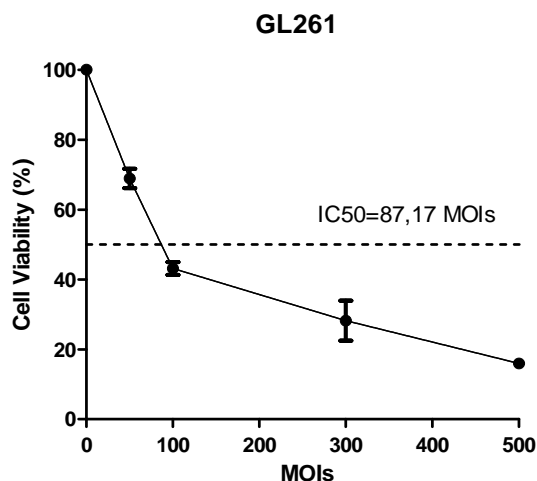


Figura 39. VCN-01 ejerce un potente efecto antitumoral en línea GL261. El análisis de la viabilidad celular fue evaluado usando MTT [3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazolio Bromuro], 5 días después de la infección con VCN-01. Los datos son mostrados con la media y la desviación estándar de las células vivas después de la infección con el virus VCN-01 con las diferentes MOIs con respecto a las células infectadas con el adenovirus VCN-01 inactivado con luz ultravioleta (control, equivalente a 100 %).

2.2. VCN-01 se replica eficientemente en líneas celulares establecidas y células madre tumorales de GBM *in vitro*.

Las líneas celulares establecidas de GBM y las células madre tumorales fueron infectadas con 1 y 10 MOIs del virus VCN-01. También, se evaluó la expresión de las proteínas E1A y Fibra a las 48 h de haber sido infectadas. Se observó un buen nivel de expresión, dosis dependiente, de ambas proteínas en todas las líneas celulares que testamos. Sin embargo, comprobamos que el virus es capaz de infectar la línea GL261 debido a la expresión de E1A pero no es capaz de replicarse e infectar las células cercanas, ya que la expresión de Fibra es inexistente (Figura 40).

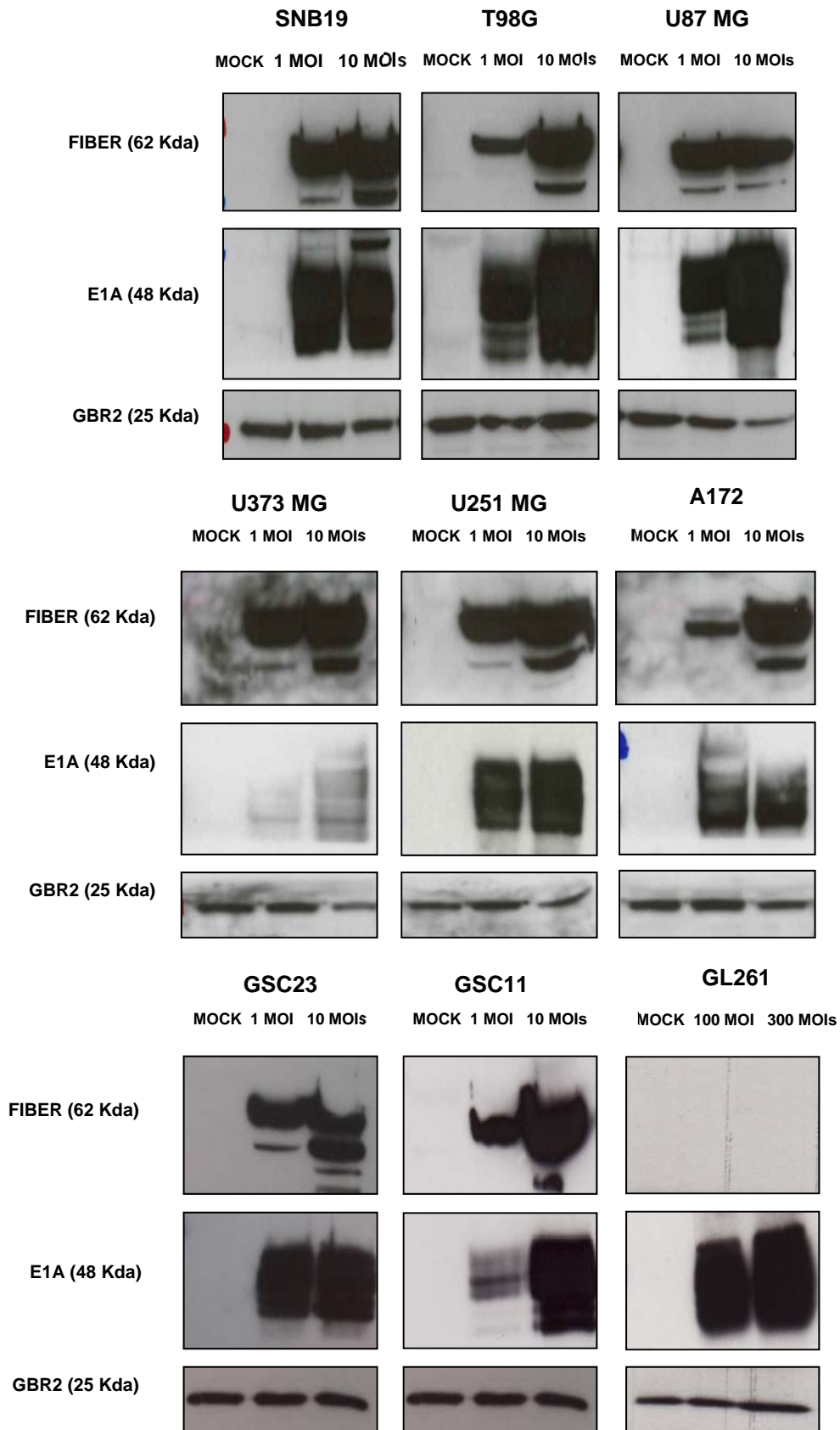


Figura 40. VCN-01 se replica eficientemente en las líneas celulares de glioma *in vitro*. Los niveles de expresión de las proteínas de la Fibra y E1A en las líneas de GBM fueron determinados mediante *Western blot*. Se comprobó que la expresión es dosis-dependiente en todas las líneas celulares de GBM humanas. No se detectó expresión de la Fibra en la línea GL261.

Por otro lado, se analizó la expresión de la hialuronidasa PH20 en las líneas celulares establecidas y células madre tumorales de GBM. Comprobamos cómo su expresión fue consistente y dosis dependiente en las tres réplicas de ambos ARN mensajeros, Fibra y PH20. En la figura 41 se representa la correlación entre la hialuronidasa PH20 y la Fibra en las líneas de GBM y neuroesferas.

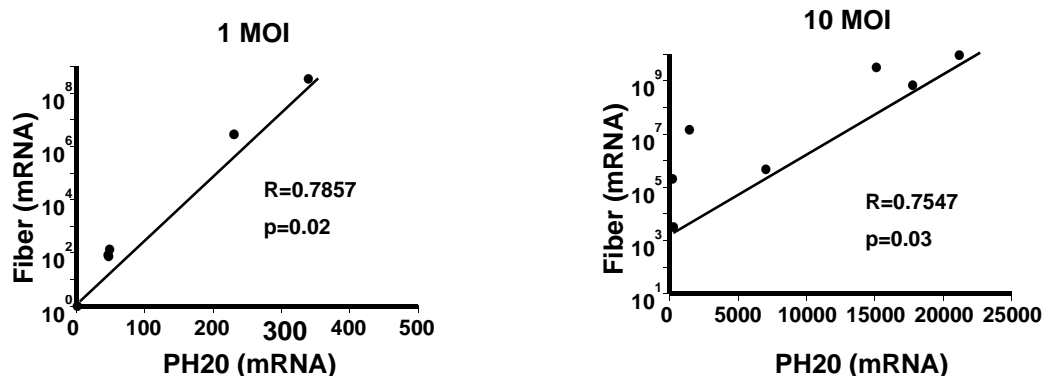


Figura 41. VCN-01 se replica eficientemente en las líneas celulares de glioblastoma humanas *in vitro*. La expresión del ARN mensajero de Fibra y PH20 fue determinada mediante PCR a tiempo real. Se demostró correlación en la expresión de ambos genes.

Estos resultados muestran que la correlación es lineal entre ambos genes. Presentan una relación lineal y significativa según los datos anteriores, en las dos dosis probadas de virus (1 MOI y 10 MOI) en todas las líneas celulares. Por tanto, este resultado vuelve a demostrar que el virus se replica eficientemente en las líneas celulares de GBM y la propagación del virus VCN-01 no se verá afectada por la matriz extracelular.

A continuación cuantificamos la replicación del virus en todas las líneas celulares y comparamos las mismas células infectadas con 1 MOI y con 10 MOIs. La línea GL261 fue infectada con 100 y 300 MOIs y como control se infectó con 100 MOIs recogiendo las células a las 4 h post-infección. Este control post-infección también se utilizó para comprobar que el virus se replica eficientemente.

Pudimos comprobar cómo el virus VCN-01 se replica eficientemente en todas las líneas celulares y en las neuroesferas. Tal y como esperábamos, el virus se replica 1 logaritmo mejor en las células infectadas con 10 MOIs que con 1 MOI. En la siguiente figura (Figura 42) se comprueba la expresión del virus en las líneas celulares y neuroesferas,

infectadas tanto con 1 MOI como con 10 MOIs, representando la media de los triplicados realizados.

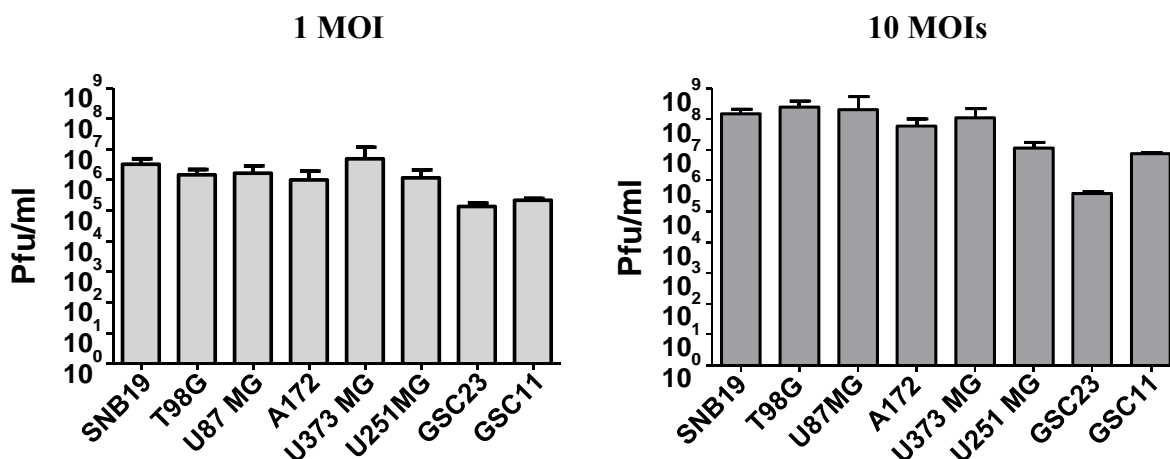


Figura 42. VCN-01 se replica eficientemente en las líneas celulares de GBM *in vitro*. Cuantificación del virus VCN-01 en la replicación viral en todas las líneas celulares. El virus se replica mejor, con un logaritmo mayor, en las líneas celulares que fueron infectadas con 10 MOIs. Esto demuestra que el virus infecta y se replica eficientemente en las líneas celulares de GBM *in vitro*. Las líneas celulares de GBM humanas fueron infectadas con dos diluciones del virus VCN-01 (1 MOI y 10 MOIs).

El virus se replica de la misma forma en las dos MOIs probadas en la línea celular GL261 (Figura 43). Se puede apreciar que el logaritmo no cambia en ninguna de las dos dosis de virus ni en el control 4 h post-infección. Esto confirma que el virus es capaz de infectar la línea GL261 pero no es capaz de replicarse en ella.

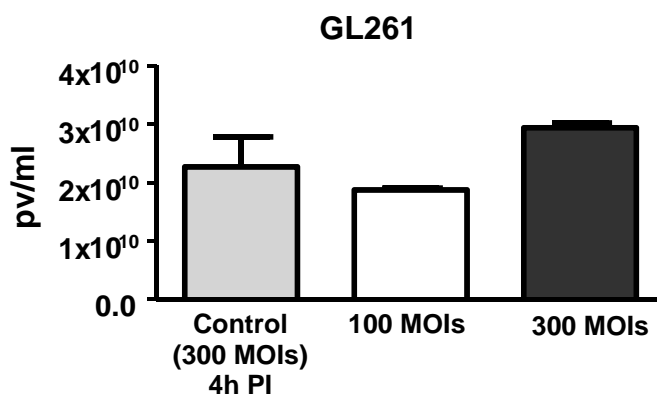


Figura 43. VCN-01 infecta la línea celular GL261 *in vitro*. Cuantificación del virus VCN-01 en la replicación viral la línea celular GL261. El virus no se replica en esta línea celular. Esto demuestra que el virus infecta pero no se replica eficientemente en la línea GL261 *in vitro*. La línea celular de GBM murino fue infectada con dos diluciones del virus VCN-01 (100 MOI y 300 MOIs).

Con este ensayo de replicación, se pudo cuantificar cómo se replica el virus con las distintas diluciones de MOIs. Confirmamos que el virus VCN-01 se replica 1 logaritmo más en las células infectadas con la menor dilución. En conclusión, en relación con la línea celular GL261, podemos afirmar que aunque el adenovirus VCN-01 es capaz de infectar esta línea, por la expresión de E1A y el logaritmo obtenido en la replicación (10^{10}), pero no es capaz de replicarse ejerciendo un efecto antitumoral eficaz. Se puede afirmar que la línea celular de ratón GL261, es una línea resistente al virus VCN-01.

Afortunadamente, este virus infecta y se replica eficientemente en todas las líneas celulares tumorales y en las neuroesferas *in vitro*. A través de estos experimentos, hemos podido comprobar que, además de tener un efecto antitumoral, demostrado en los ensayos de viabilidad celular, no hay diferencias significativas entre las líneas celulares y las neuroesferas. Además, este virus permite una expresión robusta de la hialuronidasa en todas las líneas celulares.

2.3. El tratamiento con VCN-01 resultó en un efecto antitumoral significativo en dos modelos de GBM *in vivo*.

Debido a los óptimos resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* pasamos a evaluar el efecto antiglioma *in vivo* del virus VCN-01. Realizamos dos experimentos *in vivo* en dos modelos diferentes de GBM, uno con la conocida línea U87 MG y otro con la línea de célula madre tumoral GSC23. El modelo con la línea U87 MG da lugar a tumores más definidos. Nuestro segundo modelo lo constituye la línea celular GSC23, de células madre tumorales. Este modelo da lugar a tumores más infiltrativos y difusos y se acerca más al fenotipo de los GBMs que sufren los pacientes, y se caracterizan por tener un componente sólido y otro difuso, con una extensión variable y difícil de identificar. Estos tumores constituyen una masa infiltrativa con áreas necróticas y hemorrágicas, de límites mal definidos, asociados a edema y con frecuencia al desplazamiento de las estructuras cerebrales adyacentes. El estudio microscópico muestra pleomorfismo celular con abundantes alteraciones celulares y citoplasmáticas, mitosis y necrosis y proliferación vascular con hiperplasia endotelial. Predominan las células anaplásicas de estirpe astrocítica, fusiformes con prolongaciones cortas que confieren el aspecto

fibrilar. Poseen gran capacidad de proliferación lo que explica el rápido crecimiento de estos tumores. Otros componentes son las células grandes multinucleadas más diferenciadas y de estirpe glial.

A ambos modelos, de GBM *in vivo* U87 MG y GSC23, se les administró el virus VCN-01 siguiendo el mismo patrón de administración. Al grupo control se le administró PBS, porque el virus fue inyectado en PBS. Esto evita los errores de diferencias por el vehículo y de la técnica quirúrgica. Al segundo grupo se le administró VCN-01 (1×10^7 pfu/ratón), al tercer grupo se le administró VCN-01 (1×10^8 pfu/ratón) y al cuarto grupo se le administró VCN-01 (1×10^8 pfu/ratón) inactivado con luz UV (UVi). El virus fue inyectado en un volumen final de 5 μ l.

Para el modelo con la línea U87 MG, la media de supervivencia del grupo control fue de 34 días para la línea celular, similar a la media de los ratones del grupo UVi (33 días). La media de supervivencia del grupo que recibió 1×10^7 pfu/ratón, fue de 86 días y en el grupo que recibió 1×10^8 pfu/ratón, el 70-80 % de los ratones sobrevivió más de 90 días.

Para el modelo, de la línea de neuroesferas GSC23, la media de supervivencia fue de 63 días, similar a la media de los ratones del grupo UVi (62 días). La media de supervivencia para el grupo que recibió 1×10^7 pfu/ratón, fue de 86 días. Además, el grupo que fue tratado con 1×10^8 pfu/ratón, al igual que el modelo de la línea celular U87 MG, sobrevivió más de 90 días.

En ambos modelos, la supervivencia de los ratones fue muy elevada, resultando ser significativa respecto al control. Los ratones del grupo control y del grupo UVi del modelo U87 MG comenzaron a morir hacia el día 30 después de la inoculación del tratamiento, en este caso PBS, resultado acorde con la literatura. Los otros dos grupos de tratamiento sobrevivieron más de 90 días. El resultado es, por tanto, muy favorable para el tratamiento contra los tumores cerebrales.

Los ratones del modelo de las neuroesferas GSC23, siguieron un patrón similar de supervivencia al del modelo de la línea celular U87 MG. La diferencia resultó en que estos ratones comenzaron a morir más tarde que los ratones del modelo U87 MG. El grupo control comenzó a morir pocos días después que el grupo UVi, hacia el día 60 después de la inoculación del tratamiento (PBS), pero los otros dos grupos tratados también sobrevivieron más allá de los 90 días. Podemos decir por tanto, que el virus es

efectivo contra las neuroesferas y por tanto contra las células madre tumorales. Por ello, este virus, además de replicarse eficientemente en las células tumorales, no necesita grandes dosis de tratamiento y tiene un efecto antitumoral evidente, por lo que es un posible candidato para el tratamiento contra los tumores cerebrales. Se puede comprobar la supervivencia de ambos modelos en las siguientes gráficas (Figura 44).

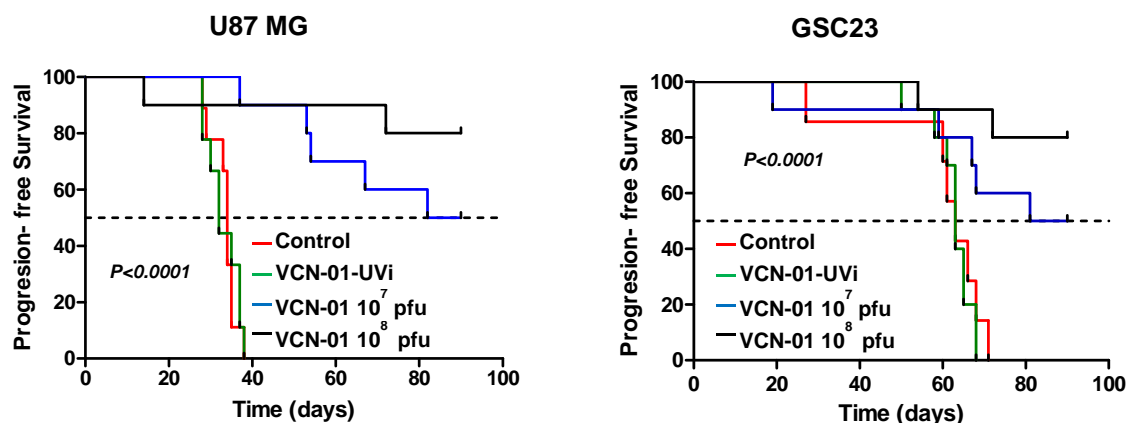


Figura 44. El tratamiento con VCN-01 produjo un significativo efecto antitumoral en dos modelos de GBM *in vivo*. Se representan las curvas de Kaplan-Meier para expresar la supervivencia global de los grupos tratados con el virus VCN-01 (10^7 pfu), VCN-01 (10^8 pfu), VCN-01-UVi (virus inactivo) y control (PBS) de los ratones con los xenoinjertos intracraneales de U87 MG y GSC23. La implantación intracraneal de las células U87 MG o GSC23 se consideró el día 0, y fue seguida de una inyección a los 3 días de VCN-01 (10^7 pfu; $n = 10$), VCN-01 (10^8 pfu; $n = 10$), VCN-01-UVi (virus inactivo; $n=10$) o PBS (control; $n = 10$). Los valores de p fueron determinados con el test long-Rank y representan una comparación de la supervivencia de los ratones tratados con VCN-01 y con PBS.

Una vez concluido el ensayo, se volvió a proceder con la extracción de los cerebros de los ratones de ambos modelos y de todos los grupos para realizar el estudio anatomopatológico. Se comprobó que las muestras del grupo control y el grupo UVi del modelo de U87 MG tenían tumores bastante voluminosos que dan lugar a efecto masa, tal y como se muestra en las imágenes (Figura 45). Este tipo de tumor era de esperar, ya que esta línea celular crea ese patrón de tumores, con crecimiento infiltrante no difuso y con una masa tumoral bien delimitada.

Además, los cerebros de los ratones tratados con VCN-01 (10^7 pfu) muestran similares tumores con presencia de zonas necróticas alrededor de las prominentes inclusiones virales, lo que sugiere una infección y replicación eficientes. Asimismo, se obtuvo un

resultado óptimo en el modelo de la línea celular U87 MG en el grupo tratado con VCN-01 (10^8 pfu) en el cual, ningún ratón mostró tumor (Figura 45).

Respecto al grupo control y el grupo UVi del modelo de GSC23, los ratones tenían tumores muy infiltrativos y difusos que en muchos de los casos cruzan el cuerpo calloso, similar al fenotipo que presentan los pacientes con GBM, como se muestra en las imágenes (Figura 45). Esta línea es mucho más agresiva, ya que es una línea celular madre tumoral y por tanto más infiltrativa y difusa que la línea celular U87 MG.

Examinando los cerebros de los ratones tratados con VCN-01 (10^7 pfu) encontramos tumores parecidos al grupo control, agresivos, infiltrativos y difusos (Figura 45). También presentan zonas necróticas alrededor de la presencia de las inclusiones virales, lo que indica que tanto la infección como la replicación son eficientes. El grupo tratado con VCN-01 (10^8 pfu) presentó un 70-80 % de ratones sin tumor (Figura 45). Por ello, se muestran los dos tipos de grupos de ratones, que había en el grupo tratado con la mayor dosis, los ratones sin tumor que sobrevivieron 90 días y los ratones que presentaron tumor. Se puede comprobar que los tumores son menos intensos, lo que sugiere menos celularidad y por tanto menor agresividad.

A continuación, se representan ver las tinciones de hematoxilina-eosina de los cerebros de los distintos grupos. Las imágenes escogidas han sido las más representativas de los tumores de todos los grupos y de ambos modelos.

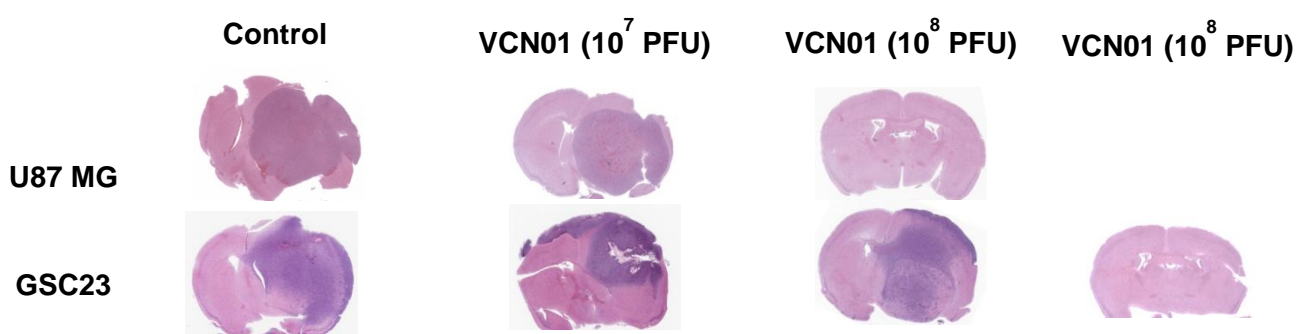


Figura 45. El tratamiento con VCN-01 produjo un significativo efecto antitumoral en dos modelos de GBM *in vivo*. Tinciones de las secciones transversales de los tumores de U87 MG o GSC23 formados, tratados con PBS o VCN-01. El aumento es 20x.

Además de las tinciones de hematoxilina–eosina, se procedió a realizar inmunohistoquímica de la proteína Hexón. Esta proteína pertenece a la cápside del adenovirus, por tanto, permite comprobar si el virus se encuentra en el tumor. Si el virus se encuentra en el tumor quiere decir que se replica e infecta eficazmente. Por otro lado, se analizó el ácido hialurónico en el tumor, para comprobar si la expresión de la hialuronidasa PH20 del virus es eficiente. Si es así, se deberá encontrar ácido hialurónico donde actúa el virus.

Analizamos los cerebros del grupo control del modelo de U87 MG. Tal y como muestran las imágenes, no se detectó ninguna proteína de Hexón en este grupo (Figura 46). Esto indica que el ensayo se ha realizado correctamente, ya que muestran el tumor pero no el virus, como era de esperar. Tampoco se encontró expresión del ácido hialurónico (Figura 47).

Los cerebros de los ratones tratados con VCN-01 (10^7 pfu) mostraron las proteínas virales en la zona del tumor (Figura 46). Esto sugiere que el virus no solo ha infectado sino que también se está replicando. También detectamos expresión del ácido hialurónico (Figura 47). Curiosamente, en el análisis de las inmunohistoquímicas de los cerebros de los supervivientes de más de 90 días, el grupo tratado con VCN-01 (10^8 pfu) del modelo de U87 MG, en el cual ningún ratón mostró tumor, no se detectó expresión de Hexón (Figura 46). Estos datos son coherentes, ya que no esperábamos detectar Hexón y por tanto, asumir que hubiera replicación viral en tejido normal. Tampoco se encontró expresión de ácido hialurónico (Figura 47).

Respecto al grupo control del modelo de GSC23 no se detectó expresión de Hexón ni expresión de ácido hialurónico (Figura 46 y 47).

Los tumores en los ratones tratados con VCN-01 (10^7 pfu) muestran expresión de la proteína Hexón (Figura 46) indicando que el virus es capaz de infectar y replicarse eficazmente en esta línea celular, a pesar de ser una línea celular más resistente que la U87 MG, tal y como se vio en el ensayo de viabilidad *in vitro*. Además, se detectó la expresión de ácido hialurónico (Figura 47), como era de esperar, en la misma zona que Hexón (Figura 46).

El grupo tratado con VCN-01 (10^8 pfu) presentó un 70-80 % de ratones sin tumor. Por ello, se muestran los dos tipos de grupos de ratones que había en el grupo tratado con la mayor dosis: los ratones sin tumor que sobrevivieron los 90 días y los ratones que presentaron tumor. Se puede comprobar que en los ratones que no tenían y no mostraron

tumor residual, los anticuerpos anti-Hexón no revelaron ninguna partícula (Figura 46). Tampoco se detectó ácido hialurónico (Figura 47). Sin embargo, los ratones que desarrollaron tumor presentaron expresión de Hexón y de ácido hialurónico en la misma zona.

A continuación, podemos ver las inmunohistoquímicas de los cerebros de los distintos grupos. Las imágenes que hemos seleccionado son las más representativas de los tumores de todos los grupos y de ambos modelos.

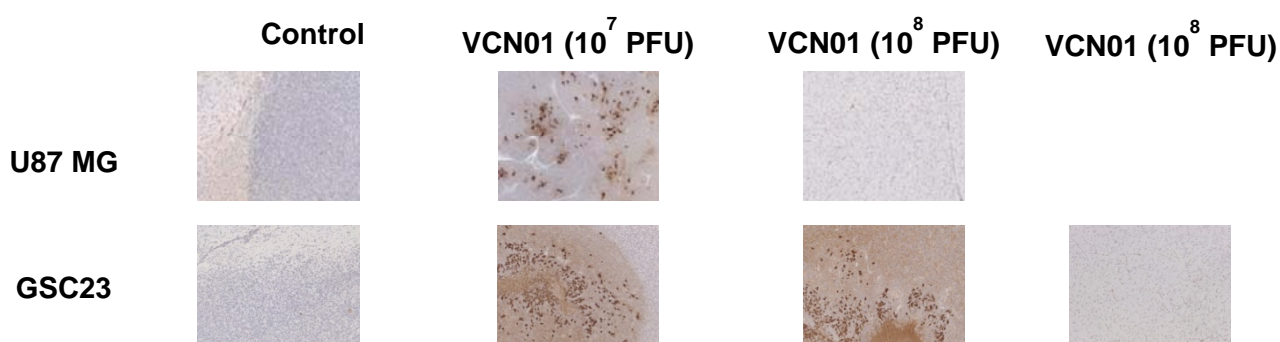


Figura 46. El tratamiento con VCN-01 produjo un significativo efecto antitumoral en dos modelos de GBM *in vivo*. Inmunohistoquímicas de Hexón de los tumores de los ratones tratados con VCN-01 (10^7 pfu), VCN-01 (10^8 pfu) y control (PBS). Las secciones fueron incubadas con el anticuerpo anti- Hexón. El aumento es 20x.

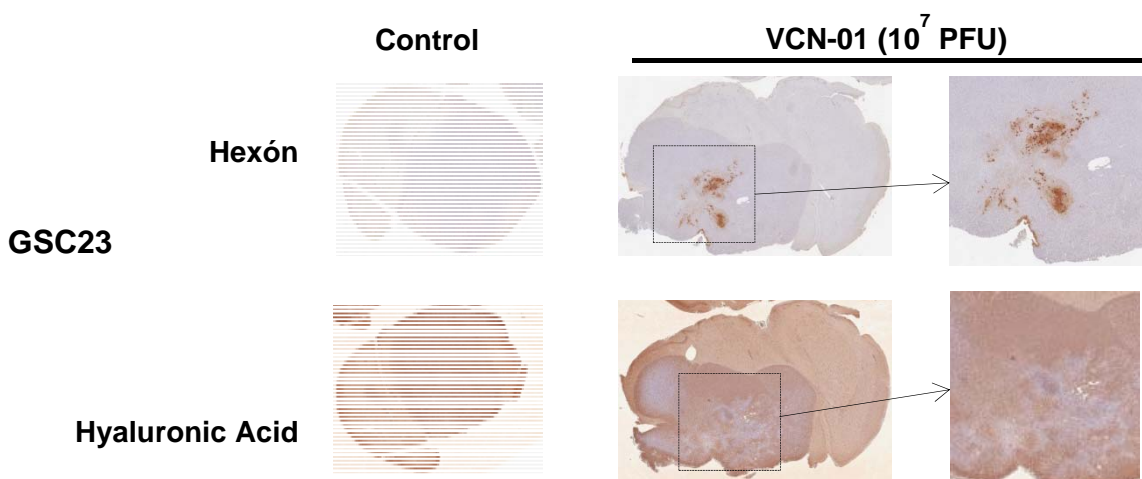


Figura 47. El tratamiento con VCN-01 produjo un significativo efecto antitumoral en dos modelos de GBM *in vivo*. Inmunohistoquímicas del ácido hialurónico de los tumores de los ratones tratados con VCN-01 (10^7 pfu), y control (PBS) de las neuroesferas GSC23. Las secciones fueron incubadas con el anticuerpo anti-ácido hialurónico. El aumento es 20x. Se incluyen sólo las imágenes más representativas de la degradación de dicho ácido en la misma zona en la que se expresa el Hexón.

Como podemos ver, los resultados en ambos modelos de ratones, *in vivo*, modelo de U87 MG y modelo de GSC23, neuroesferas, son esperanzadores. Vemos que el virus tiene un efecto antitumoral evidente en los grupos tratados con 10^7 pfu pero sobre todo, en los grupos tratados con 10^8 pfu, ya que el 70-80 % de los ratones se curaron totalmente sin mostrar ningún resto de tumor.

Discusión

DISCUSIÓN

El cáncer resulta de la pérdida de la regulación fisiológica de la proliferación celular y/o apoptosis, como consecuencia de la adquisición de alteraciones en el material genético.

Estas alteraciones pueden provocar una ganancia o pérdida de la función de la/s proteína/s codificadas. En ambos casos, el cambio puede conducir a que la célula adquiera una ventaja proliferativa y pierda su capacidad de diferenciación, pudiendo también evadirse de la muerte celular programada o apoptosis. Estas alteraciones genéticas pueden encontrarse en la línea germinal, provocando una predisposición heredable al desarrollo del fenotipo neoplásico, o ser somáticas, dando lugar a la formación de tumores esporádicos (Vogelstein & Kinzler, 2004; Bernheim, 2010). A su vez, las alteraciones somáticas pueden ser primarias o generadoras del tumor (*drivers*), o secundarias (*passenger*), que son las que surgen posteriormente de manera acumulativa y que pueden estar relacionadas con la evolución de la enfermedad (Mitelman *et al.*, 2007). La diferencia entre ambas se realiza en base a su actividad en ensayos funcionales *in vitro* o *in vivo* y a su aparición en los distintos estadios de la enfermedad.

El tumor neuroectodérmico primitivo supratentorial (PNET) es un tumor maligno de estirpe embrionaria (células neuroepiteliales indiferenciadas o pobremente indiferenciadas). Todos corresponden a un grado IV de la OMS (velocidad de crecimiento tumoral acelerado) afectando principalmente a niños. El 65% se diagnostican en niños menores de 5 años de edad. Corresponde al 2,5-6% de todos los tumores cerebrales en niños. Aunque raro, pueden presentarse también en adultos. No existe predilección de géneros, afectando por igual tanto al sexo masculino como al femenino. Histológicamente es indistinguible del MB (otro tumor embrionario maligno localizado en el cerebelo), aunque se comporta de forma más agresiva que éste y con menor tasa de supervivencia. Los PNETs suelen observarse comúnmente en los hemisferios cerebrales y por ser altamente propensos a su diseminación, pueden propagarse a la médula espinal y a la región supraselar del cerebro (área alrededor del quiasma óptico).

Es un tumor muy poco diferenciado con núcleos celulares redondeados e irregulares. Se suelen observar rosetas de Homer-Wright aunque su frecuencia varía de tumor a tumor.

Las calcificaciones se suelen identificar en las áreas más degeneradas y en ocasiones incluso pueden observarse áreas con proliferación de endotelio muscular.

Estos tumores presentan alteraciones de distintas vías de señalización (Dahmane *et al.*, 2001; Kees *et al.*, 1994) y alteraciones de la genética molecular y citogenética implicando deleciones, translocaciones y más pérdidas que ganancias de cromosomas lo que da lugar a pérdidas de material genético.

A pesar de estos estudios, el pronóstico no es muy alentador. En adultos, los PNETs tienen una supervivencia del 75% a los 3 años con una media de supervivencia de 86 meses. En niños la supervivencia a los 3 años es del 73% de los afectados, con una media de supervivencia de 68 meses. El tratamiento actual es la neurocirugía con adyuvancia de radioterapia y quimioterapia pero no es un tratamiento eficaz y definitivo contra estos tumores.

Por otro lado, los gliomas se producen en el cerebro o en la médula espinal. Surgen a partir de células gliales y su ubicación más frecuente es en el cerebro. El GBM está clasificado como glioma astrocítico de grado IV de la OMS, y se da sobre todo en adultos a una edad media de 55 años. Estos pacientes tienen muy mal pronóstico, ya que el promedio de tiempo de supervivencia es de 12 meses, y en general, pocos pacientes sobreviven más allá de 3 años, ya que es un glioma muy agresivo. Por ello, nuestro proyecto se centró en el análisis del tratamiento del GBM ya que actualmente no hay ningún tratamiento totalmente eficaz contra estos tumores.

En los últimos años se han encontrado alteraciones en varios genes y distintas vías de señalización alteradas que pueden estar implicados en la génesis de esta enfermedad. Sin embargo, a pesar de todos estos esfuerzos todavía no se ha logrado un tratamiento realmente eficaz para estos pacientes, ya que las terapias actuales contra el GBM sólo consiguen retrasar la progresión del tumor unos meses.

Los virus oncolíticos suponen una nueva generación de tratamientos contra estos tumores. En distintos estudios se ha demostrado que los virus oncolíticos potencialmente pueden eliminar las células tumorales directamente por lisis, o indirectamente a través de la respuesta inmune.

Por consiguiente, en el presente trabajo hemos evaluado el posible uso del virus oncolítico VCN-01 como agente terapéutico contra el GBM.

El virus Delta-24-RGD

El virus Delta-24-RGD es un virus oncolítico del que ya se conocen sus propiedades antitumorales (Jiang *et al.*, 2007, Alonso *et al.*, 2008). Este adenovirus presenta las siguientes características:

- ✓ Deleción de 24 pares de bases en la región E1A (E1a- Δ 24).
- ✓ La proteína Fibra con la modificación del RGD, que permite el reconocimiento de las integrinas $\alpha\beta$ 3 y $\alpha\beta$ 5.
- ✓ El promotor endógeno de E1A hace al virus selectivo a las células que son deficientes en RB.

A continuación, se representa un esquema del adenovirus Delta-24-RGD (Figura 48).

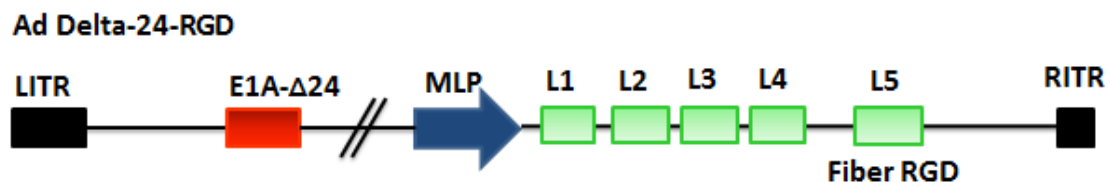


Figura 48. Estructura del adenovirus Delta-24-RGD. Se representan todos los genes que caracterizan a este virus (E1A- Δ 24, promotor MPL, genes tardíos L1-L5 y Fibra RGD).

El virus Delta-24-RGD es un adenovirus oncolítico de replicación competente con una alta selectividad para las células tumorales de glioma. La alta selectividad de Delta-24-RGD para células de glioma se basa en la supresión 24 pares de bases del gen E1A, y hace que la replicación viral dependa de la inactivación de RB. El motivo RGD en la Fibra resulta en el aumento de la infectividad del virus Delta-24-RGD. Debido a que en las células tumorales de los tumores cerebrales, la expresión de CAR, en general es baja (Miller *et al.*, 1998), esta modificación permite limitar la infectividad del adenovirus y, por lo tanto, proporcionar un efecto citopático en estas células.

Además, las células tumorales que presentan la vía de señalización del RB alterada, son las células dianas para este virus, ya que son altamente selectivos.

Los resultados de Fueyo *et al.* demuestran que esta modificación proporciona al virus Delta-24-RGD un efecto antiglioma potente y selectivo en células con baja expresión de CAR (Fueyo *et al.*, 2003). Por lo tanto, la modificación del tropismo mejora los resultados.

El 60% de los animales con xenoinjertos de la línea celular U87 MG y tratados con el virus Delta-24-RGD sobrevivieron más allá de los 90 días, obteniendo una supervivencia de largo plazo. Estos datos proporcionaron una evidencia de la importancia de la modificación RGD de vectores adenovirales (Fueyo *et al.*, 2003).

Se concluyó que los adenovirus oncolíticos que se dirigen a la vía RB/E2F son probablemente uno de los sistemas más eficientes y selectivos contra GBM. Además, se demostró que el aumento de tropismo de este sistema, a través de la incorporación genética del péptido RGD en el virus Delta-24, mejoró dramáticamente la eficiencia antiglioma y mantuvo la selectividad de este adenovirus en células tumorales (Fueyo *et al.*, 2003).

El virus VCN-01

El virus VCN-01 es un adenovirus oncolítico de nueva generación desarrollado por la modificación genética de la plataforma ICOVIR (Rodríguez-García *et al.*, 2015). Posee 37600 pares de bases y distintos motivos que lo hacen selectivo de células tumorales. Destacan los siguientes motivos:

- ✓ Los ocho sitios de unión E2F que aportan selectividad de replicación en células tumorales.
- ✓ El promotor con 24 pares de bases delecionadas, E1A- Δ 24 que aporta, también, selectividad de replicación en células tumorales.
- ✓ La proteína Fibra con la modificación del RGDK que ayuda en la focalización del virus a los tumores y aumenta la biodistribución selectiva en el tumor.

- ✓ La inserción de la hialuronidasa PH20 que mejora la propagación del virus en el tumor.

A continuación se representa un esquema del adenovirus VCN-01 (Figura 49).

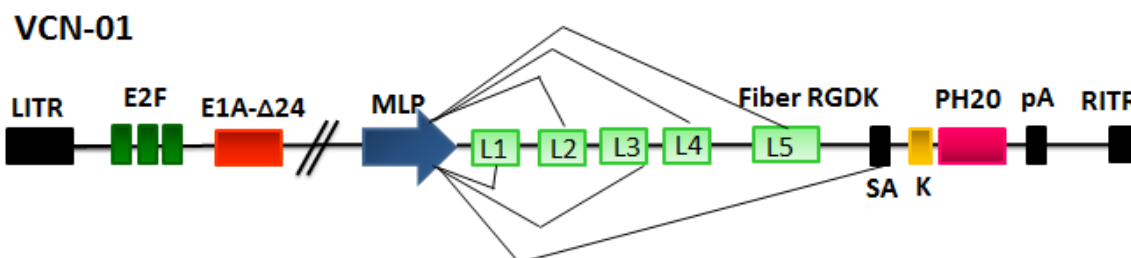


Figura 49. Estructura del adenovirus VCN-01. Se representan todos los genes que caracterizan a este virus (E2F, E1A-Δ24, promotor MLP, genes tardíos L1-L5, Fibra RGDK y PH20).

El virus VCN-01 es un adenovirus de la familia ICOVIR. Hace varios años nuestro grupo publicó los resultados de un estudio sobre el efecto antiglioma de un precursor de VCN-01, el virus ICOVIR-5, que combina el gen E1A con la mutación Delta 24 de forma aislada del promotor E2F. Posteriormente, el promotor E2F se incluyó en el ICOVIR-5. El ICOVIR-5 resultaba menos potente que el mismo adenovirus sin el promotor E2F. El adenovirus ICOVIR-5 tiene también la secuencia de Kozak en el codón de inicio de E1A, y esta secuencia es importante para restaurar la expresión de E1A y la replicación viral del virus AdwtRGD, adenovirus parental del ICOVIR-5, en las células tumorales. El virus ICOVIR-5 resultó ser un vector altamente selectivo en la preclínica de modelos de GBM (Alonso *et al.*, 2007) y no tóxico para el modelo animal cuando se administró sistémicamente (Casallo *et al.*, 2007). Además, avanzando en el desarrollo de los adenovirus antitumorales, se construyó el ICOVIR-15 al que se le incorporó en el sitio de unión de pRB la inserción de ocho sitios de unión a E2F y un sitio de unión de Sp1 en el nucleótido 415 de genoma del adenovirus, bajo el control del promotor endógeno de E1a-Δ24, que lo hace selectivo para la replicación en células tumorales que tienen la vía de señalización de la proteína retinoblastoma defectuosa (Fueyo, *et al.*, 2003). Esta característica también hace que el virus VCN-01 sea un buen método para combatir estos tumores, ya que presentan la vía de señalización del retinoblastoma alterada (Chow *et al.*, 2011).

Otra característica es la Fibra RGD (Arg-Gly-Asp). Esta modificación ya la tenía el virus AdwtRGD, el virus ICOVIR-5 y el virus ICOVIR-15 lo que hace que estos virus tengan como objetivo las células tumorales (Bayo-Puxan *et al.*, 2009), ya que permite la unión de la Fibra con las integrinas de membrana, ya mencionadas en el apartado de Material y Métodos, en la sección de Material, porque las células tumorales carecen del receptor CAR (Iguchi *et al.*, 2012). Además, se incluyó una K (lisina) en el ICOVIR-15, con lo que se construyó el ICOVIR-15K. Esta K (Lys) permitió que el virus fuera más efectivo contra estas células tumorales (Rodríguez-García *et al.*, 2015).

Este virus expresa la enzima hialuronidasa PH20. El virus AdwtRGD-PH20 expresa esta enzima. Como se vio que degradaba eficientemente el ácido hialurónico, el cassette de expresión de la hialuronidasa PH20 se insertó en el ICOVIR-15, obteniéndose el ICOVIR-17.

Los virus que expresan enzimas que degradan la matriz extracelular están siendo utilizados para mejorar su propagación en los tumores sólidos (Smith & Lichty, 2011).

El grupo de Ramón Alemany ha demostrado que la expresión PH20 por un adenovirus oncolítico degrada la ECM, mejora la propagación viral a través de la masa tumoral y mejora la eficacia global antitumoral sin aumentar su toxicidad (Rodríguez-García *et al.*, 2015). También ha demostrado que una dosis única de hialuronidasa en combinación con un adenovirus oncolítico es suficiente para mejorar la distribución del adenovirus dentro de la masa tumoral y mejorar su actividad antitumoral. En estudios anteriores se ha publicado que la degradación de ECM mejora la propagación viral y por lo tanto es enormemente ventajoso para la viroterapia oncolítica (Ganesh *et al.*, 2008).

Estos experimentos tuvieron distintas limitaciones, como que el efecto de la hialuronidasa sobre la modulación de la matriz extracelular es transitorio y reversible dentro de las primeras 48 horas. Por lo tanto, la mejora de la actividad antitumoral observada con la terapia de combinación se debe probablemente a la producción temprana de los virus después del inicio del tratamiento.

Mediante el uso de este método, Ganesh, S. *et al* demostraron que el tratamiento de combinación de un adenovirus oncolítico y la PH20 humana recombinante aumenta significativamente la actividad antitumoral y la supervivencia de los animales portadores de tumores en dos modelos diferentes. Por ello, diseñaron un virus que

expresaba la enzima PH20 (Guedan *et al.*, 2010), el virus ICOVIR-17 (virus parental del virus VCN-01). Pero como este virus no tenía la modificación RGDK de la Fibra, el grupo de Ramón Alemany, insertó el cassette de expresión en el ICOVIR-15K consiguiendo de esta manera el virus VCN-01 (Guedan *et al.*, 2010).

Los tumores con gran cantidad de ácido hialurónico son tumores de pulmón, colorrectales, de mama, de próstata, páncreas o de vejiga, por ello, son buenos candidatos para ser tratados con este virus ya que no hay un tratamiento realmente efectivo para estos tumores. Por tanto, en estudios anteriores, se ha analizado la efectividad del virus VCN-01 mediante ensayos *in vitro* para comprobar la eficacia de este virus en líneas celulares establecidas de melanoma (SkMel-28), de adenocarcinoma de pulmón (A549), de carcinoma de próstata (PC3), células tumorales de páncreas (BxPC3, Rwp1 y MiaPaCa-2), de colon (HTCC116) y de riñón (HEK293). También utilizaron células tumorales de tumores de cabeza y cuello (SCC-29) (Guedan *et al.*, 2010; Rodriguez-Garcia *et al.*, 2015). Finalmente, se hicieron estudios *in vivo* con ratones inmunocompetentes en los que la vía de administración fue sistémica o intratumoral.

Los resultados *in vitro* arrojados por estos ensayos mostraron que este virus era significativamente más efectivo contra las líneas celulares tumorales mencionadas anteriormente, comparado con sus virus parentales, el adenovirus ICOVIR-17 (expresa la enzima PH20) y el virus ICOVIR-15K (presenta la modificación RGDK que aporta mayor infectividad en la células tumorales). Igualmente, fue capaz de disminuir el volumen del tumor significativamente, comparado con el ICOVIR-15 y el ICOVIR-17 en los ensayos *in vivo*. Además, los estudios no mostraron toxicidad cuando se inyectó el virus VCN-01 por vía intravenosa, comparado con ICOVIR-5 y el ICOVIR-17. Por lo tanto, VCN-01 es un vector seguro cuando se administra sistémicamente y presenta un efecto antitumoral significativo en diferentes tumores sólidos (Rodriguez-Garcia *et al.*, 2015).

1. Los PNETs y los GBMs frente a Delta-24-RGD y VCN-01

Los PNETs tienen una matriz extracelular marcada por calcificaciones y rosetas de Homer-Wright. Además, presentan la vía de señalización del RB alterada. De estas células, por otro lado, se conoce la disminución de la expresión de CAR, pero la expresión de las integrinas $\alpha\beta3$ y $\alpha\beta5$ es correcta (Shen *et al.*, 2016). Por ello, estos tumores se pueden considerar buenos candidatos para su terapia con el virus Delta-24-RGD además de con el virus VCN-01.

Por su parte, el GBM presenta una gran cantidad de ácido hialurónico en su matriz extracelular (Knupfer *et al.*, 1998), al igual que los tumores anteriormente mencionados, por lo que el GBM sería un buen candidato para su tratamiento con este virus. Además, la vía de señalización del RB está alterada en estos tumores (Goldhoff *et al.*, 2012), haciendo que sean buenos objetivos para el virus VCN-01.

2. La expresión de CAR, Integrinas $\alpha\beta3$ y $\alpha\beta5$ y la infectividad

Los resultados obtenidos en la línea celular PFSK-1 se corresponden con la bibliografía en la que se afirma que la expresión de CAR está disminuida en tumores cerebrales (Miller *et al.*, 1998, Asaoka *et al.*, 2000). Sin embargo, la línea celular SK-PN-DW difiere ya que la expresión de CAR es muy elevada. Además, la expresión de CAR también se correlaciona con la eficacia de la infección adenoviral (Lamfers *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 1998), que está directamente relacionado con el nivel de la expresión de las Integrinas $\alpha\beta3$ y $\alpha\beta5$.

En nuestros resultados observamos como la expresión de la integrina $\alpha\beta5$ es elevada en ambas líneas celulares, sin embargo, la expresión de la integrina $\alpha\beta3$ sólo es evidente en la línea celular PFSK-1. Por ello, la infección es mayor en la línea celular PFSK-1 que en la SK-PN-DW.

Por tanto, nuestros resultados demuestran que éstas líneas celulares son fácilmente infectadas por los virus oncolíticos, ya que estos virus se internalizan en las células tumorales gracias a la modificación de la Fibra, el motivo RGD. Este motivo permite la

interacción de la Fibra con las integrinas $\alpha\beta3$ y $\alpha\beta5$ cuando la expresión de CAR es muy baja.

3. La viabilidad celular

Para evaluar la efectividad antitumoral de los virus hicimos ensayos de viabilidad celular. Pudimos ver que el virus VCN-01 tuvo un efecto antitumoral sobre las líneas de PNETs más potente, que el efecto del virus Delta-24-RGD. La IC50 fue menor en el virus VCN-01, por lo que se necesita menos cantidad de este virus para conseguir matar al 50% de células. El virus VCN-01 ejerció un efecto antitumoral sobre las líneas celulares de GBM muy elevado.

Estos resultados están avalados por los estudios realizados previamente por Alonso *et al* y Hong Jiang *et al*. En ambos estudios, se hace referencia al efecto antitumoral que tiene el virus Delta-24-RGD, además de que estas células tumorales son diana de este virus (Alonso *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2007).

Por otro lado, el virus VCN-01 es efectivo en células de carcinoma de pulmón, melanoma, carcinoma de páncreas, de cabeza y cuello, como se describe en el trabajo de Rodriguez-Garcia *et al* (Rodriguez-Garcia *et al.*, 2015). Por ello, el efecto antitumoral que ha tenido este virus frente a las células de GBM se corresponde con los estudios de Rodriguez-Garcia *et al*.

4. La replicación viral

Estudiamos la replicación viral del virus Delta-24-RGD y VCN-01 en las líneas de PNETs y GBM. Para ello, realizamos distintos ensayos cuyos resultados discutimos a continuación.

La replicación viral fue analizada mediante el *Western blot*. Para este experimento se estudiaron las proteínas Fibra y E1A. Se escogieron estas proteínas ya que se expresan en distinto tiempo: E1A es una proteína temprana (Gubbay *et al.*, 1990) que se expresará siempre que el virus infecte a la célula, y la Fibra es una proteína tardía de la cápside, que sólo se expresará si el virus se ha formado en su totalidad (Ahí & Mittal,

2016). Al analizar estas proteínas pudimos conocer si el virus infectaba las células, además de si se replicaba o no. Por ello, ambas proteínas son buenos candidatos para analizar el grado de infección de las líneas celulares.

Los resultados obtenidos se corresponden con la bibliografía, se esperaba que la infección fuera elevada y la replicación ocurriera de forma dosis dependiente en ambos virus (Alonso *et al.*, 2012). Estos resultados también están relacionados con la viabilidad celular, ya que a mayor infección y mayor replicación, mayor muerte celular.

Por otro lado, se analizó la expresión de la hialuronidasa PH20 del virus VCN-01, tanto en PNETs como en GBM. En todas las líneas de ambos tumores se expresó la hialuronidasa PH20, incluso de manera dosis dependiente, ya que la expresión de la Fibra también fue de forma dosis dependiente. Además, la correlación de ambos genes se pudo representar con una línea recta. Esto indica que ambos genes siguen la misma tendencia.

En los estudios de Ganesh *et al* se demostró que la administración de hialuronidasa mejora la potencia viral en los modelos de tumores metastásicos (Ganesh *et al.*, 2008). Por ello, los resultados sugieren que el virus no tendría problemas a la hora de su propagación por el tumor, ya que iría rompiendo el ácido hialurónico a través de la expresión de la hialuronidasa PH20. Estos tumores presentan mucho ácido hialurónico en su matriz extracelular, por ello, la correcta expresión de hialuronidasa en las células tumorales de glioma podría mejorar la efectividad del virus, *in vivo*.

Finalmente, en los experimentos de replicación viral se pudo analizar que ambos virus, en todos los tipos de líneas celulares, tanto de PNETs como de GBM se replicaban mejor a dosis más altas. Además, el virus VCN-01 se replica mejor que el virus Delta-24-RGD.

Los estudios publicados por Alonso *et al* y Rodríguez-García *et al* respaldan nuestros resultados, ya que podemos ver que realmente el virus VCN-01 se replica de forma más eficaz que el virus Delta-24-RGD. El equipo de Ramón Alemany demostró que el virus VCN-01 se replica mejor que sus virus parentales (Rodríguez-García *et al.*, 2015) y el virus Delta-24-RGD obtiene una replicación más elevada si se combina con un medicamento quimioterápico (Alonso *et al.*, 2008).

5. El efecto antitumoral

En el estudio *in vivo* con las células PNETs observamos que a pesar de que la supervivencia no fue muy elevada, comparando ambos virus en cada línea, tuvieron la misma línea de supervivencia.

Los estudios de Jiang, H. *et al* afirmaron que el virus Delta-24-RGD ejerce un efecto antitumoral en los ensayos realizados *in vivo* (Jiang *et al.*, 2014). Por otro lado, en los estudios realizados por Rodríguez-García *et al* se obtuvieron datos en los que vieron como el virus VCN-01 disminuye el tumor de manera significativa en los ensayos *in vivo*, realizados con ratones atímicos en tumores de melanoma y carcinoma pancreático comparado con el control (Rodríguez-García *et al.*, 2015). Por ello, estos estudios se correlacionan con nuestros resultados, en los que vemos un efecto antitumoral significativamente positivo.

Además, Rodríguez-García *et al* demostraron que el virus VCN-01 se mantenía en el tiempo, mientras hubiera tumor. Por ello, en las inmunohistoquímicas de los cerebros de la proteína Hexón, mostraron que el virus sólo se detectaba en los cerebros que tenían tumor (Rodríguez-García *et al.*, 2015).

Por consiguiente, no se encontraron virus ni Delta-24-RGD ni VCN-01 en los cerebros de ratones que no presentaron tumor. Estos resultados indican que el virus sólo se replica en las células tumorales.

Aunque la supervivencia fue parecida en ambos virus en las líneas celulares de PNETs, sólo evaluamos el virus VCN-01 en las líneas celulares de GBM. Del virus VCN-01 se conoce que no tiene tanta toxicidad (Rodríguez-García *et al.*, 2015) como el virus Delta-24-RGD (Jiang *et al.*, 2014), además de que tiene un efecto antitumoral, infección y replicación, mayor que éste último.

En el estudio *in vivo* de GBM, se utilizaron dos modelos tumorales diferentes. En ambos modelos se ha demostrado la actividad antitumoral efectiva con una sola inyección. El virus infecta eficazmente las células tumorales establecidas y se replica en todas las líneas celulares de glioblastoma tal y como se demuestra en los tumores estudiados en el equipo de Juan Rojas (Rodríguez-García *et al.*, 2015).

Además, como se ha comentado anteriormente, las inmunohistoquímicas de los cerebros de la proteína Hexón también revelaron que no se encontraba el virus en el tejido normal, en los cerebros que no desarrollaron tumor. Sin embargo, si se encontraron virus en los tumores desarrollados. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el virus sólo se replica en las células tumorales.

Por tanto, después de comparar el virus Delta-24-RGD con el virus VCN-01 en las células de PNETs y analizar este último virus, en las líneas celulares de GBM se puede determinar que el efecto antitumoral del virus VCN-01 ha mejorado debido a la expresión de una hialuronidasa soluble (PH20) y por la modificación del motivo RGDK de la Fibra.

Otra consideración no cubierta por nuestro estudio es el efecto de VCN-01 en un modelo inmunocompetente. Se ha especulado que el efecto antitumoral del virus se debe no sólo al efecto oncolítico intrínseco del mismo, sino también al desencadenamiento de una respuesta inmune contra el virus y a su vez contra las células tumorales. A este respecto, es interesante observar que la hialuronidasa es inmunogénica (Chiarella *et al.*, 2013, Hodge-Dufour *et al.*, 1997, Horton *et al.*, 1998a, Horton *et al.*, 1998b, Horton *et al.*, 1999).

Sin embargo, podemos afirmar que el adenovirus VCN-01, ejerce un efecto antitumoral eficiente ya que el 70-80% de los ratones de ambos modelos de GBM no presentaron tumor a la hora del sacrificio. Por ello, a pesar de la falta del modelo inmunocompetente, el virus VCN-01 es un buen candidato para un posible tratamiento clínico.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. Los adenovirus Delta-24-RGD y VCN-01 son capaces de infectar, replicarse y matar a líneas celulares establecidas de Tumores Neuroectodérmicos Primitivos (PNETs).
2. El adenovirus VCN-01 mostró un mejor efecto antitumoral *in vitro* que el Delta-24-RGD en las líneas celulares de PNETs.
3. La expresión de la enzima PH20 del virus VCN-01 es dosis-dependiente en todas las líneas celulares PNETs tratadas. La expresión de la enzima PH20 se correlaciona con la proteína Fibra.
4. Los adenovirus VCN-01 y Delta-24-RGD mostraron un efecto antitumoral *in vivo* robusto. Ambos virus alargaron significativamente la media de supervivencia de ratones con tumores ortotópicos de PNET.
5. El adenovirus VCN-01 es capaz de infectar, replicarse y matar a líneas celulares establecidas de Glioblastoma (GBM).
6. El adenovirus VCN-01 mostró un efecto antitumoral *in vitro* en las líneas celulares de GBM.
7. La expresión de la enzima PH20 del virus VCN-01 es dosis-dependiente en todas las líneas celulares de GBM tratadas. La expresión de la enzima PH20 se correlaciona con la proteína Fibra.
8. El adenovirus VCN-01 mostró un efecto antitumoral *in vivo* robusto aumentando la media de supervivencia respecto al control significativamente en ratones con tumores ortotópicos de GBM. En principio, parece ser un buen candidato como posible tratamiento clínico.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Ahi, Y.S. & Mittal, S.K. 2016, "Components of Adenovirus Genome Packaging", *Frontiers in Microbiology*, vol. 7, pp. 1503.
- Alonso, M.M., Cascallo, M., Gomez-Manzano, C., Jiang, H., Bekele, B.N., Perez-Gimenez, A., Lang, F.F., Piao, Y., Alemany, R. & Fueyo, J. 2007, "ICOVIR-5 shows E2F1 addiction and potent antiglioma effect in vivo", *Cancer Research*, vol. 67, no. 17, pp. 8255-8263.
- Alonso, M.M., Jiang, H., Gomez-Manzano, C. & Fueyo, J. 2012, "Targeting brain tumor stem cells with oncolytic adenoviruses", *Methods in Molecular Biology*, vol. 797, pp. 111-125.
- Alonso, M.M., Jiang, H., Yokoyama, T., Xu, J., Bekele, N.B., Lang, F.F., Kondo, S., Gomez-Manzano, C. & Fueyo, J. 2008, "Delta-24-RGD in combination with RAD001 induces enhanced anti-glioma effect via autophagic cell death", *Molecular Therapy*, vol. 16, no. 3, pp. 487-493.
- Asaoka, K., Tada, M., Sawamura, Y., Ikeda, J. & Abe, H. 2000, "Dependence of efficient adenoviral gene delivery in malignant glioma cells on the expression levels of the Coxsackievirus and adenovirus receptor", *Journal of Neurosurgery*, vol. 92, no. 6, pp. 1002-1008.
- Bailey, P., Cushing, H. 1926, "A classification of the tumors of the glioma group on a Histogenetic Basis with a Correlated Study of Prognosis", J.B. Lippincott Company, Philadelphia.
- Batchelor, T.T., Mulholland, P., Neyns, B., Nabors, L.B., Campone, M., Wick, A., Mason, W., Mikkelsen, T., Phuphanich, S., Ashby, L.S., Degroot, J., Gattamaneni, R., Cher, L., Rosenthal, M., Payer, F., Jurgensmeier, J.M., Jain, R.K., Sorensen, A.G., Xu, J., Liu, Q. & van den Bent, M. 2013, "Phase III randomized trial comparing the efficacy of cediranib as monotherapy, and in combination with lomustine, versus lomustine alone in patients with recurrent glioblastoma", *Journal of Clinical Oncology*, vol. 31, no. 26, pp. 3212-3218.
- Baumgartner, G., Gomar-Hoss, C., Sakr, L., Ulsperger, E. & Wogritsch, C. 1998, "The impact of extracellular matrix on the chemoresistance of solid tumors-experimental and clinical results of hyaluronidase as additive to cytostatic chemotherapy", *Cancer Letters*, vol. 131, no. 1, pp. 85-99.
- Bayani, J., Zielenska, M., Marrano, P., Kwan Ng, Y., Taylor, M.D., Jay, V., Rutka, J.T. & Squire, J.A. 2000, "Molecular cytogenetic analysis of medulloblastomas and supratentorial primitive neuroectodermal tumors

- by using conventional banding, comparative genomic hybridization, and spectral karyotyping", *Journal of Neurosurgery*, vol. 93, no. 3, pp. 437-448.
- Bayo-Puxan, N., Gimenez-Alejandre, M., Lavilla-Alonso, S., Gros, A., Cascallo, M., Hemminki, A. & Alemany, R. 2009, "Replacement of adenovirus type 5 fiber shaft heparan sulfate proteoglycan-binding domain with RGD for improved tumor infectivity and targeting", *Human Gene Therapy*, vol. 20, no. 10, pp. 1214-1221.
- Behin, A., Hoang-Xuan, K., Carpentier, A.F. & Delattre, J.Y. 2003, "Primary brain tumours in adults", *Lancet*, vol. 361, no. 9354, pp. 323-331.
- Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., Droguett, G., Kurt-Jones, E.A., Krithivas, A., Hong, J.S., Horwitz, M.S., Crowell, R.L., Finberg, R.W. 1997, "Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5" *Science*, vol. 275, no. 5304, pp. 1320-3.
- Bernheim, A. 2010, "Cytogenomics of cancers: from chromosome to sequence", *Molecular Oncology*, vol. 4, no. 4, pp. 309-322.
- Bissola, L., Eoli, M., Pollo, B., Merciai, B.M., Silvani, A., Salsano, E., Maccagnano, C., Bruzzone, M.G., Fuhrman Conti, A.M., Solero, C.L., Giombini, S., Broggi, G., Boiardi, A. & Finocchiaro, G. 2002, "Association of chromosome 10 losses and negative prognosis in oligoastrocytomas", *Annals of Neurology*, vol. 52, no. 6, pp. 842-845.
- Bocangel, D.B., Finkelstein, S., Schold, S.C., Bhakat, K.K., Mitra, S. & Kokkinakis, D.M. 2002, "Multifaceted resistance of gliomas to temozolomide", *Clinical Cancer Research*, vol. 8, no. 8, pp. 2725-2734.
- Brandes, A.A., Franceschi, E., Tosoni, A. (2010). "Efficacy of tailored treatment for high- and low-risk medulloblastoma in adults: A large prospective phase II trial". *Journal of Clinical Oncology*. ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition) 28: 2003.
- Buckner, J.C., Brown, P.D., O'Neill, B.P., Meyer, F.B., Wetmore, C.J. & Uhm, J.H. 2007, "Central nervous system tumors", *Mayo Clinic Proceedings*, vol. 82, no. 10, pp. 1271-1286.
- Burger, P.C. & Kleihues, P. 1989, "Cytologic composition of the untreated glioblastoma with implications for evaluation of needle biopsies", *Cancer*, vol. 63, no. 10, pp. 2014-2023.
- Cairncross, J.G., Ueki, K., Zlatescu, M.C., Lisle, D.K., Finkelstein, D.M., Hammond, R.R., Silver, J.S., Stark, P.C., Macdonald, D.R., Ino, Y., Ramsay, D.A. & Louis, D.N. 1998, "Specific genetic predictors of chemotherapeutic

- response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas", *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 90, no. 19, pp. 1473-1479.
- Carson, K.A., Grossman, S.A., Fisher, J.D. & Shaw, E.G. 2007, "Prognostic factors for survival in adult patients with recurrent glioma enrolled onto the new approaches to brain tumor therapy CNS consortium phase I and II clinical trials", *Journal of Clinical Oncology*, vol. 25, no. 18, pp. 2601-2606.
- Cascallo, M., Alonso, M.M., Rojas, J.J., Perez-Gimenez, A., Fueyo, J. & Alemany, R. 2007, "Systemic toxicity-efficacy profile of ICOVIR-5, a potent and selective oncolytic adenovirus based on the pRB pathway", *Molecular Therapy*, vol. 15, no. 9, pp. 1607-1615.
- Chen, Y.G., Hata, A., Lo, R.S., Wotton, D., Shi, Y., Pavletich, N., Massagué, J. 1998, "Determinants of specificity in TGF-beta signal transduction", *Genes & Development*, vol. 15, no. 14, pp. 2144-52.
- Chiarella, P., De Santis, S., Fazio, V.M. & Signori, E. 2013, "Hyaluronidase contributes to early inflammatory events induced by electrotransfer in mouse skeletal muscle", *Human Gene Therapy*, vol. 24, no. 4, pp. 406-416.
- Chow, L.M., Endersby, R., Zhu, X., Rankin, S., Qu, C., Zhang, J., Broniscer, A., Ellison, D.W. & Baker, S.J. 2011, "Cooperativity within and among Pten, p53, and Rb pathways induces high-grade astrocytoma in adult brain", *Cancer Cell*, vol. 19, no. 3, pp. 305-316.
- Clarke, I.D. & Dirks, P.B. 2003, "A human brain tumor-derived PDGFR-alpha deletion mutant is transforming", *Oncogene*, vol. 22, no. 5, pp. 722-733.
- Costello, J.F., Plass, C., Arap, W., Chapman, V.M., Held, W.A., Berger, M.S., Su Huang, H.J. & Cavenee, W.K. 1997, "Cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) amplification in human gliomas identified using two-dimensional separation of genomic DNA", *Cancer Research*, vol. 57, no. 7, pp. 1250-1254.
- Dahmane, N., Sanchez, P., Gitton, Y., Palma, V., Sun, T., Beyna, M., Weiner, H. & Ruiz i Altaba, A. 2001, "The Sonic Hedgehog-Gli pathway regulates dorsal brain growth and tumorigenesis", *Development*, vol. 128, no. 24, pp. 5201-5212.
- Dai, C., Celestino, J.C., Okada, Y., Louis, D.N., Fuller, G.N. & Holland, E.C. 2001, "PDGF autocrine stimulation dedifferentiates cultured astrocytes and induces oligodendrogliomas and oligoastrocytomas from neural progenitors and astrocytes in vivo", *Genes & Development*, vol. 15, no. 15, pp. 1913-1925.

- Daumas-Duport, C., Scheithauer, B., O'Fallon, J. & Kelly, P. 1988, "Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method", *Cancer*, vol. 62, no. 10, pp. 2152-2165.
- Deltour, I., Johansen, C., Auvinen, A., Feychting, M., Klaeboe, L. & Schuz, J. 2009, "Time trends in brain tumor incidence rates in Denmark, Finland, Norway, and Sweden, 1974-2003", *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 101, no. 24, pp. 1721-1724.
- Denny, B.J., Wheelhouse, R.T., Stevens, M.F., Tsang, L.L. & Slack, J.A. 1994, "NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA", *Biochemistry*, vol. 33, no. 31, pp. 9045-9051.
- Deorah, S., Lynch, C.F., Sibenaller, Z.A. & Ryken, T.C. 2006, "Trends in brain cancer incidence and survival in the United States: Surveillance, Epidemiology, and End Results Program, 1973 to 2001", *Neurosurgical Focus*, vol. 20, no. 4, pp. E1.
- Di Rocco, F., Carroll, R.S., Zhang, J. & Black, P.M. 1998, "Platelet-derived growth factor and its receptor expression in human oligodendrogliomas", *Neurosurgery*, vol. 42, no. 2, pp. 341-346.
- Diccianni, M.B., Omura-Minamisawa, M., Batova, A., Le, T., Bridgeman, L. & Yu, A.L. 1999, "Frequent deregulation of p16 and the p16/G1 cell cycle-regulatory pathway in neuroblastoma", *International Journal of Cancer*, vol. 80, no. 1, pp. 145-154.
- Ding, H., Roncari, L., Shannon, P., Wu, X., Lau, N., Karaskova, J., Gutmann, D.H., Squire, J.A., Nagy, A. & Guha, A. 2001, "Astrocyte-specific expression of activated p21-ras results in malignant astrocytoma formation in a transgenic mouse model of human gliomas", *Cancer Research*, vol. 61, no. 9, pp. 3826-3836.
- Ding, H., Shannon, P., Lau, N., Wu, X., Roncari, L., Baldwin, R.L., Takebayashi, H., Nagy, A., Gutmann, D.H. & Guha, A. 2003, "Oligodendrogliomas result from the expression of an activated mutant epidermal growth factor receptor in a RAS transgenic mouse astrocytoma model", *Cancer Research*, vol. 63, no. 5, pp. 1106-1113.
- Donoghue, J.F., Bogler, O. & Johns, T.G. 2011, "A simple guide screw method for intracranial xenograft studies in mice", *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, vol. (55). pii: 3157. doi, no. 55, pp. 10.3791/3157.
- Fan, X., Wang, Y., Kratz, J., Brat, D.J., Robitaille, Y., Moghrabi, A., Perlman, E.J., Dang, C.V., Burger, P.C. & Eberhart, C.G. 2003, "hTERT gene amplification

- and increased mRNA expression in central nervous system embryonal tumors", *The American Journal of Pathology*, vol. 162, no. 6, pp. 1763-1769.
- Fischhaber, P.L., Gall, A.S., Duncan, J.A., Hopkins, P.B. 1999, "Direct demonstration in synthetic oligonucleotides that N,N'-bis(2-chloroethyl)-nitrosourea cross links N1 of deoxyguanosine to N3 of deoxycytidine on opposite strands of duplex DNA", *Cancer Research*, vol. 59, no. 17, pp. 4363-8.
- Fisher, J.L., Schwartzbaum, J.A., Wrensch, M. & Wiemels, J.L. 2007, "Epidemiology of brain tumors", *Neurologic Clinics*, vol. 25, no. 4, pp. 867-90, vii.
- Frederick, L., Wang, X.Y., Eley, G. & James, C.D. 2000, "Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas", *Cancer Research*, vol. 60, no. 5, pp. 1383-1387.
- Fredman, J.N. & Engler, J.A. 1993, "Adenovirus precursor to terminal protein interacts with the nuclear matrix in vivo and in vitro", *Journal of Virology*, vol. 67, no. 6, pp. 3384-3395.
- Fueyo, J., Alemany, R., Gomez-Manzano, C., Fuller, G.N., Khan, A., Conrad, C.A., Liu, T.J., Jiang, H., Lemoine, M.G., Suzuki, K., Sawaya, R., Curiel, D.T., Yung, W.K. & Lang, F.F. 2003, "Preclinical characterization of the antiglioma activity of a tropism-enhanced adenovirus targeted to the retinoblastoma pathway", *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 95, no. 9, pp. 652-660.
- Fuxe, J., Liu, L., Malin, S., Philipson, L., Collins, V.P. & Pettersson, R.F. 2003, "Expression of the coxsackie and adenovirus receptor in human astrocytic tumors and xenografts", *International Journal of Cancer*, vol. 103, no. 6, pp. 723-729.
- Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De Vitis, S., Fiocco, R., Foroni, C., Dimeco, F. & Vescovi, A. 2004, "Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma", *Cancer Research*, vol. 64, no. 19, pp. 7011-7021.
- Gaggar, A., Shayakhmetov, D.M., Lieber, A. 2003, "CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses", *Nature Medicine*, vol. 9, no. 11, pp. 1408-12.
- Ganesh, S., Gonzalez-Edick, M., Gibbons, D., Van Roey, M. & Jooss, K. 2008, "Intratatumoral coadministration of hyaluronidase enzyme and oncolytic adenoviruses enhances virus potency in metastatic tumor models", *Clinical Cancer Research*, vol. 14, no. 12, pp. 3933-3941.

- Gerson, S.L. 2002, "Clinical relevance of MGMT in the treatment of cancer", *Journal of Clinical Oncology*, vol. 20, no. 9, pp. 2388-2399.
- Giaginis, C.T., Zarros, A.C., Papaefthymiou, M.A., Papadopouli, A.E., Sfiniadakis, I.K. & Theocharis, S.E. 2008, "Coxsackievirus and adenovirus receptor expression in human endometrial adenocarcinoma: possible clinical implications", *World Journal of Surgical Oncology*, vol. 6, pp. 59-7819-6-59.
- Ginsberg, H.S., Lundholm-Beauchamp, U., Horswood, R.L., Pernis, B., Wold, W.S., Chanock, R.M., Prince, G.A. 1989, "Role of early region 3 (E3) in pathogenesis of adenovirus disease". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, vol. 86, no. 10, pp. 3823-7.
- Goldhoff, P., Clarke, J., Smirnov, I., Berger, M.S., Prados, M.D., James, C.D., Perry, A. & Phillips, J.J. 2012, "Clinical stratification of glioblastoma based on alterations in retinoblastoma tumor suppressor protein (RB1) and association with the proneural subtype", *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, vol. 71, no. 1, pp. 83-89.
- Gorlia, T., Stupp, R., Brandes, A.A., Rampling, R.R., Fumoleau, P., Ditttrich, C., Campone, M.M., Twelves, C.C., Raymond, E., Hegi, M.E., Lacombe, D. & van den Bent, M.J. 2012, "New prognostic factors and calculators for outcome prediction in patients with recurrent glioblastoma: a pooled analysis of EORTC Brain Tumour Group phase I and II clinical trials", *European Journal of Cancer*, vol. 48, no. 8, pp. 1176-1184.
- Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Munsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P., Lovell-Badge, R. 1990, "A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes". *Nature*, vol. 346, pp. 245-250.
- Guedan, S., Rojas, J.J., Gros, A., Mercade, E., Cascallo, M. & Alemany, R. 2010, "Hyaluronidase expression by an oncolytic adenovirus enhances its intratumoral spread and suppresses tumor growth", *Molecular Therapy*, vol. 18, no. 7, pp. 1275-1283.
- Guha, A., Feldkamp, M.M., Lau, N., Boss, G. & Pawson, A. 1997, "Proliferation of human malignant astrocytomas is dependent on Ras activation", *Oncogene*, vol. 15, no. 23, pp. 2755-2765.
- Hadjipanayis, C.G. & Van Meir, E.G. 2009, "Brain cancer propagating cells: biology, genetics and targeted therapies", *Trends in Molecular Medicine*, vol. 15, no. 11, pp. 519-530.

- Henson, J.W., Schnitker, B.L., Correa, K.M., von Deimling, A., Fassbender, F., Xu, H.J., Benedict, W.F., Yandell, D.W. & Louis, D.N. 1994, "The retinoblastoma gene is involved in malignant progression of astrocytomas", *Annals of Neurology*, vol. 36, no. 5, pp. 714-721.
- Hess, K.R., Broglio, K.R. & Bondy, M.L. 2004, "Adult glioma incidence trends in the United States, 1977-2000", *Cancer*, vol. 101, no. 10, pp. 2293-2299.
- Hodge-Dufour, J., Noble, P.W., Horton, M.R., Bao, C., Wysoka, M., Burdick, M.D., Strieter, R.M., Trinchieri, G., Puré, E. 1997, "Induction of IL-12 and chemokines by hyaluronan requires adhesion-dependent priming of resident but not elicited macrophages", *Journal of Immunology*, vol. 159, no. 5, pp.2492-500.
- Holland, E.C. 2000, "Glioblastoma multiforme: the terminator", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 12, pp. 6242-6244.
- Holland, E.C., Celestino, J., Dai, C., Schaefer, L., Sawaya, R.E. & Fuller, G.N. 2000, "Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice", *Nature Genetics*, vol. 25, no. 1, pp. 55-57.
- Homma, T., Fukushima, T., Vaccarella, S., Yonekawa, Y., Di Patre, P.L., Franceschi, S. & Ohgaki, H. 2006, "Correlation among pathology, genotype, and patient outcomes in glioblastoma", *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, vol. 65, no. 9, pp. 846-854.
- Hong Jiang, Karen Clise-Dwyer, Kathryn E. Ruisaard, Xuejun Fan, Weihua Tian, Joy Gumin, Martine L. Lamfers, Anne Kleijn, Frederick F. Lang, Wai-Kwan Alfred Yung, Luis M. Vence, Candelaria Gomez-Manzano, Juan Fueyo. 2014, "Delta-24-RGD Oncolytic Adenovirus Elicits Anti-Glioma Immunity in an Immunocompetent Mouse Model", *PLoS One*, vol. 9, no.5, e97407.
- Hong, T.S., Mehta, M.P., Boyett, J.M., Donahue, B., Rorke, L.B., Yao, M.S. & Zeltzer, P.M. 2004, "Patterns of failure in supratentorial primitive neuroectodermal tumors treated in Children's Cancer Group Study 921, a phase III combined modality study", *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, vol. 60, no. 1, pp. 204-213.
- Horton, M.R., Burdick, M.D., Strieter, R.M., Bao, C. & Noble, P.W. 1998, "Regulation of hyaluronan-induced chemokine gene expression by IL-10 and IFN-gamma in mouse macrophages", *Journal of Immunology*, vol. 160, no. 6, pp. 3023-3030.
- Horton, M.R., McKee, C.M., Bao, C., Liao, F., Farber, J.M., Hodge-DuFour, J., Pure, E., Oliver, B.L., Wright, T.M. & Noble, P.W. 1998, "Hyaluronan

- fragments synergize with interferon-gamma to induce the C-X-C chemokines mig and interferon-inducible protein-10 in mouse macrophages", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 52, pp. 35088-35094.
- Horton, M.R., Shapiro, S., Bao, C., Lowenstein, C.J. & Noble, P.W. 1999, "Induction and regulation of macrophage metalloelastase by hyaluronan fragments in mouse macrophages", *Journal of Immunology*, vol. 162, no. 7, pp. 4171-4176.
- Hu, X., Pandolfi, P.P., Li, Y., Koutcher, J.A., Rosenblum, M. & Holland, E.C. 2005, "mTOR promotes survival and astrocytic characteristics induced by Pten/AKT signaling in glioblastoma", *Neoplasia (New York, N.Y.)*, vol. 7, no. 4, pp. 356-368.
- Huse, J.T. & Holland, E.C. 2010, "Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma", *Nature Reviews Cancer*, vol. 10, no. 5, pp. 319-331.
- Ibarra, M.S. & O'Brien, J.M. 2000, "Is screening for primitive neuroectodermal tumors in patients with unilateral retinoblastoma necessary?", *Journal of the American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus*, vol. 4, no. 1, pp. 54-56.
- Ignatova, T.N., Kukekov, V.G., Laywell, E.D., Suslov, O.N., Vrionis, F.D. & Steindler, D.A. 2002, "Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro", *Glia*, vol. 39, no. 3, pp. 193-206.
- Iguchi, K., Sakurai, F., Tomita, K., Katayama, K., Yamaguchi, T., Kawabata, K., Tagawa, M., Kawabata, M., Shirakawa, T. & Mizuguchi, H. 2012, "Efficient antitumor effects of carrier cells loaded with a fiber-substituted conditionally replicating adenovirus on CAR-negative tumor cells", *Cancer Gene Therapy*, vol. 19, no. 2, pp. 118-125.
- Ino, Y., Betensky, R.A., Zlatescu, M.C., Sasaki, H., Macdonald, D.R., Stemmer-Rachamimov, A.O., Ramsay, D.A., Cairncross, J.G. & Louis, D.N. 2001, "Molecular subtypes of anaplastic oligodendroglioma: implications for patient management at diagnosis", *Clinical Cancer Research*, vol. 7, no. 4, pp. 839-845.
- Jaeckle, K.A., Eyre, H.J., Townsend, J.J., Schulman, S., Knudson, H.M., Belanich, M., Yarosh, D.B., Bearman, S.I., Giroux, D.J. & Schold, S.C. 1998, "Correlation of tumor O6 methylguanine-DNA methyltransferase levels with survival of malignant astrocytoma patients treated with bis-chloroethylnitrosourea: a Southwest Oncology Group study", *Journal of Clinical Oncology*, vol. 16, no. 10, pp. 3310-3315.

- Jakacki, R.I., Zeltzer, P.M., Boyett, J.M., Albright, A.L., Allen, J.C., Geyer, J.R., Rorke, L.B., Stanley, P., Stevens, K.R., Wisoff, J. 1995, "Survival and prognostic factors following radiation and/or chemotherapy for primitive neuroectodermal tumors of the pineal region in infants and children: a report of the Childrens Cancer Group", *Journal Clinical Oncology*, vol. 13, no.6, pp.1377-83.
- James, C.D., Carlbom, E., Dumanski, J.P., Hansen, M., Nordenskjold, M., Collins, V.P. & Cavenee, W.K. 1988, "Clonal genomic alterations in glioma malignancy stages", *Cancer Research*, vol. 48, no. 19, pp. 5546-5551.
- Jiang, H., Gomez-Manzano, C., Aoki, H., Alonso, M.M., Kondo, S., McCormick, F., Xu, J., Kondo, Y., Bekele, B.N., Colman, H., Lang, F.F. & Fueyo, J. 2007, "Examination of the therapeutic potential of Delta-24-RGD in brain tumor stem cells: role of autophagic cell death", *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 99, no. 18, pp. 1410-1414.
- Jiang H., Clise-Dwyer K., Ruisaard K.E., Fan X., Tian W., Gumin J., Lamfers M.L., Kleijn A., Lang F.F., Yung W.K., Vence L.M., Gomez-Manzano C. & Fueyo J. 2014, "Delta-24-RGD oncolytic adenovirus elicits anti-glioma immunity in an immunocompetent mouse model", *PloS One*, vol. 9, no. 5, e97407.
- Jukich, P.J., McCarthy, B.J., Surawicz, T.S., Freels, S. & Davis, F.G. 2001, "Trends in incidence of primary brain tumors in the United States, 1985-1994", *Neuro-Oncology*, vol. 3, no. 3, pp. 141-151.
- Kees, U.R., Biegel, J.A., Ford, J., Ranford, P.R., Peroni, S.E., Hallam, L.A., Parmiter, A.H., Willoughby, M.L. & Spagnolo, D. 1994, "Enhanced MYCN expression and isochromosome 17q in pineoblastoma cell lines", *Genes, Chromosomes & Cancer*, vol. 9, no. 2, pp. 129-135.
- Kernohan, J.W. & Mabon, R.F. 1949, "A simplified classification of the gliomas", *Proceedings of the Staff Meetings of the Mayo Clinic*, vol. 24, no. 3, pp. 71-75.
- Knudsen, E.S. & Wang, J.Y. 2010, "Targeting the RB-pathway in cancer therapy", *Clinical Cancer Research*, vol. 16, no. 4, pp. 1094-1099.
- Knupfer, M.M., Poppenborg, H., Hotfilder, M., Domula, M. & Wolff, J.E. 1998, "Hyaluronic acid binding capacity of malignant glioma cells", *Anticancer Research*, vol. 18, no. 1A, pp. 353-356.
- Kwon, C.H., Zhao, D., Chen, J., Alcantara, S., Li, Y., Burns, D.K., Mason, R.P., Lee, E.Y., Wu, H. & Parada, L.F. 2008, "Pten haploinsufficiency accelerates formation of high-grade astrocytomas", *Cancer Research*, vol. 68, no. 9, pp. 3286-3294.

- Laemmli, U.K., Molbert, E., Showe, M. & Kellenberger, E. 1970, "Form-determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4", *Journal of Molecular Biology*, vol. 49, no. 1, pp. 99-113.
- Lal, S., Lacroix, M., Tofilon, P., Fuller, G.N., Sawaya, R. & Lang, F.F. 2000, "An implantable guide-screw system for brain tumor studies in small animals", *Journal of Neurosurgery*, vol. 92, no. 2, pp. 326-333.
- Lamfers, M.L., Grill, J., Dirven, C.M., Van Beusechem, V.W., Georger, B., Van Den Berg, J., Alemany, R., Fueyo, J., Curiel, D.T., Vassal, G., Pinedo, H.M., Vandertop, W.P. & Gerritsen, W.R. 2002, "Potential of the conditionally replicative adenovirus Ad5-Delta24RGD in the treatment of malignant gliomas and its enhanced effect with radiotherapy", *Cancer Research*, vol. 62, no. 20, pp. 5736-5742.
- Lasorella, A., Boldrini, R., Dominici, C., Donfrancesco, A., Yokota, Y., Inserra, A. & Iavarone, A. 2002, "Id2 is critical for cellular proliferation and is the oncogenic effector of N-myc in human neuroblastoma", *Cancer Research*, vol. 62, no. 1, pp. 301-306.
- Lawson, H.C., Sampath, P., Bohan, E., Park, M.C., Hussain, N., Olivi, A., Weingart, J., Kleinberg, L., Brem, H. 2007, "Interstitial chemotherapy for malignant gliomas: the Johns Hopkins experience", *Journal of Neuro-Oncology*, vol. 83, no.1, pp. 61-70.
- Leopold, P.L., Kreitzer, G., Miyazawa, N., Rempel, S., Pfister, K.K., Rodriguez-Boulan, E. & Crystal, R.G. 2000, "Dynein- and microtubule-mediated translocation of adenovirus serotype 5 occurs after endosomal lysis", *Human Gene Therapy*, vol. 11, no. 1, pp. 151-165.
- Li, D., Duan, L., Freimuth, P. & O'Malley, B.W., Jr 1999, "Variability of adenovirus receptor density influences gene transfer efficiency and therapeutic response in head and neck cancer", *Clinical Cancer Research*, vol. 5, no. 12, pp. 4175-4181.
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S.I., Puc, J., Miliareis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S.H., Giovanella, B.C., Ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M.H. & Parsons, R. 1997, "PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer", *Science*, vol. 275, no. 5308, pp. 1943-1947.
- Libermann, T.A., Nusbaum, H.R., Razon, N., Kris, R., Lax, I., Soreq, H., Whittle, N., Waterfield, M.D., Ullrich, A. & Schlessinger, J. 1985, "Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin", *Nature*, vol. 313, no. 5998, pp. 144-147.

- Libermann, T.A., Razon, N., Bartal, A.D., Yarden, Y., Schlessinger, J. & Soreq, H. 1984, "Expression of epidermal growth factor receptors in human brain tumors", *Cancer Research*, vol. 44, no. 2, pp. 753-760.
- Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., Ng, H., Abdulkadir, I.R., Lu, L., Irvin, D., Black, K.L. & Yu, J.S. 2006, "Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma", *Molecular Cancer*, vol. 5, pp. 67.
- Louis, D.N. 1994, "The p53 gene and protein in human brain tumors", *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, vol. 53, no. 1, pp. 11-21.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W. & Kleihues, P. 2007, "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system", *Acta Neuropathologica*, vol. 114, no. 2, pp. 97-109.
- Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P. & Ellison, D.W. 2016, "The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary", *Acta Neuropathologica*, vol. 131, no. 6, pp. 803-820.
- Malkin, D., Li, F.P., Strong, L.C., Fraumeni, J.F., Jr Nelson, C.E., Kim, D.H., Kassel, J., Gryka, M.A., Bischoff, F.Z. & Tainsky, M.A. 1990, "Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms". *Science*, vol. 250, no. 4985, pp. 1233-38.
- Mathias, P., Wickham, T., Moore, M., Nemerow, G. 1994, "Multiple adenovirus serotypes use alpha v integrins for infection". *Journal of Virology*, vol. 10, pp. 6811-4.
- Miller, C.R., Buchsbaum, D.J., Reynolds, P.N., Douglas, J.T., Gillespie, G.Y., Mayo, M.S., Raben, D. & Curiel, D.T. 1998, "Differential susceptibility of primary and established human glioma cells to adenovirus infection: targeting via the epidermal growth factor receptor achieves fiber receptor-independent gene transfer", *Cancer Research*, vol. 58, no. 24, pp. 5738-5748.
- Miller, C.R. & Perry, A. 2007, "Glioblastoma", *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, vol. 131, no. 3, pp. 397-406.
- Mitelman, F., Johansson, B. & Mertens, F. 2007, "The impact of translocations and gene fusions on cancer causation", *Nature Reviews Cancer*, vol. 7, no. 4, pp. 233-245.
- Moriuchi, S., Shimizu, K., Miyao, Y. & Hayakawa, T. 1996, "An immunohistochemical analysis of medulloblastoma and PNET with

- emphasis on N-myc protein expression", *Anticancer Research*, vol. 16, no. 5A, pp. 2687-2692.
- Mosmann, T. 1983, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays", *Journal of Immunological Methods*, vol. 65, no. 1-2, pp. 55-63.
- Nicholson, J.C., Ross, F.M., Kohler, J.A. & Ellison, D.W. 1999, "Comparative genomic hybridization and histological variation in primitive neuroectodermal tumours", *British Journal of Cancer*, vol. 80, no. 9, pp. 1322-1331.
- Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Farah, P., Ondracek, A., Chen, Y., Wolinsky, Y., Stroup, N.E., Kruchko, C. & Barnholtz-Sloan, J.S. 2013, "CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010", *Neuro-Oncology*, vol. 15 Suppl 2, pp. ii1-56.
- Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Liao, P., Rouse, C., Chen, Y., Dowling, J., Wolinsky, Y., Kruchko, C. & Barnholtz-Sloan, J. 2014, "CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011", *Neuro-Oncology*, vol. 16 Suppl 4, pp. iv1-63.
- Patrawala, L., Calhoun, T., Schneider-Broussard, R., Zhou, J., Claypool, K. & Tang, D.G. 2005, "Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2+ and ABCG2- cancer cells are similarly tumorigenic", *Cancer Research*, vol. 65, no. 14, pp. 6207-6219.
- Pirouzmand, F. & Sadanand, V. 2007, "The incidence trends of primary brain tumors in Saskatchewan from 1970 to 2001", *The Canadian Journal of Neurological Sciences*, vol. 34, no. 2, pp. 181-186.
- Reifenberger, G., Reifenberger, J., Ichimura, K., Meltzer, P.S. & Collins, V.P. 1994, "Amplification of multiple genes from chromosomal region 12q13-14 in human malignant gliomas: preliminary mapping of the amplicons shows preferential involvement of CDK4, SAS, and MDM2", *Cancer Research*, vol. 54, no. 16, pp. 4299-4303.
- Reilly, K.M., Loisel, D.A., Bronson, R.T., McLaughlin, M.E. & Jacks, T. 2000, "Nf1;Trp53 mutant mice develop glioblastoma with evidence of strain-specific effects", *Nature Genetics*, vol. 26, no. 1, pp. 109-113.
- Ringertz, N. 1950, "Grading of gliomas", *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, vol. 27, no. 1, pp. 51-64.
- Rodriguez-Garcia, A., Gimenez-Alejandre, M., Rojas, J.J., Moreno, R., Bazan-Peregrino, M., Cascallo, M. & Alemany, R. 2015, "Safety and efficacy of VCN-01, an oncolytic adenovirus combining fiber HSG-binding domain

- replacement with RGD and hyaluronidase expression", *Clinical Cancer Research*, vol. 21, no. 6, pp. 1406-1418.
- Rowe, W.P., Huebner, R.J., Gilmore, L.K., Parrott, R.H. & Ward, T.G. 1953, "Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture", *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 84, no. 3, pp. 570-573.
- Schmittgen, T.D. and Livak, K.J. 2008, "Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method". *Nature Protocols*, vol. 3, pp. 1101-1108.
- Schwartz, A.M., Ghatak, N.R. & Laine, F.J. 1990, "Intrasellar primitive neuroectodermal tumor (PNET) in familial retinoblastoma: a variant of "trilateral retinoblastoma"", *Clinical Neuropathology*, vol. 9, no. 2, pp. 55-59.
- Schwartzbaum, J.A., Fisher, J.L., Aldape, K.D. & Wrensch, M. 2006, "Epidemiology and molecular pathology of glioma", *Nature Clinical Practice Neurology*, vol. 2, no. 9, pp. 494-503; quiz 1 p following 516.
- Shen, Y.H., Yang, F., Wang, H., Cai, Z.J., Xu, Y.P., Zhao, A., Su, Y., Zhang, G. & Zhu, S.X. 2016, "Arg-Gly-Asp (RGD)-Modified E1A/E1B Double Mutant Adenovirus Enhances Antitumor Activity in Prostate Cancer Cells In Vitro and in Mice", *PLoS one*, vol. 11, no. 1, pp. e0147173.
- Shenk, T. 1996. "Adenoviridae: The viruses and their replication". In: Fields B.N., Knipe D. M. and Howley P. M. (Eds), *Fundamental Virology*. Lippincott-Raven: Philadelphia. pp. 979-1016.
- Shete, S., Hosking, F.J., Robertson, L.B., Dobbins, S.E., Sanson, M., Malmer, B., Simon, M., Marie, Y., Boisselier, B., Delattre, J.Y., Hoang-Xuan, K., El Hallani, S., Idbaih, A., Zelenika, D., Andersson, U., Henriksson, R., Bergenheim, A.T., Feychting, M., Lonn, S., Ahlbom, A., Schramm, J., Linnebank, M., Hemminki, K., Kumar, R., Hepworth, S.J., Price, A., Armstrong, G., Liu, Y., Gu, X., Yu, R., Lau, C., Schoemaker, M., Muir, K., Swerdlow, A., Lathrop, M., Bondy, M. & Houlston, R.S. 2009, "Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma", *Nature Genetics*, vol. 41, no. 8, pp. 899-904.
- Shih, A.H., Dai, C., Hu, X., Rosenblum, M.K., Koutcher, J.A. & Holland, E.C. 2004, "Dose-dependent effects of platelet-derived growth factor-B on glial tumorigenesis", *Cancer Research*, vol. 64, no. 14, pp. 4783-4789.
- Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J. & Dirks, P.B. 2003, "Identification of a cancer stem cell in human brain tumors", *Cancer Research*, vol. 63, no. 18, pp. 5821-5828.

- Smith, E., Breznik, J. & Lichty, B.D. 2011, "Strategies to enhance viral penetration of solid tumors", *Human Gene Therapy*, vol. 22, no. 9, pp. 1053-1060.
- Smith, J.S., Perry, A., Borell, T.J., Lee, H.K., O'Fallon, J., Hosek, S.M., Kimmel, D., Yates, A., Burger, P.C., Scheithauer, B.W. & Jenkins, R.B. 2000, "Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed oligoastrocytomas", *Journal of Clinical Oncology*, vol. 18, no. 3, pp. 636-645.
- Smith, M.A., Freidlin, B., Ries, L.A. & Simon, R. 1998, "Trends in reported incidence of primary malignant brain tumors in children in the United States", *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 90, no. 17, pp. 1269-1277.
- Srivastava, S., Zou, Z.Q., Pirollo, K., Blattner, W. & Chang, E.H. 1990, "Germline transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome", *Nature*, vol. 348, no. 6303, pp. 747-749.
- Stewart, L.A. 2002, "Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials", *Lancet*, vol. 23, no. 359, pp. 1011-8
- Sugawa, N., Ekstrand, A.J., James, C.D. & Collins, V.P. 1990, "Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 87, no. 21, pp. 8602-8606.
- Suzuki, K., Alemany, R., Yamamoto, M. & Curiel, D.T. 2002, "The presence of the adenovirus E3 region improves the oncolytic potency of conditionally replicative adenoviruses", *Clinical Cancer Research*, vol. 8, no. 11, pp. 3348-3359.
- Taal, W., Oosterkamp, H.M., Walenkamp, A.M., Dubbink, H.J., Beerepoot, L.V., Hanse, M.C., Buter, J., Honkoop, A.H., Boerman, D., de Vos F.Y., Dinjens, W.N., Enting, R.H., Taphoorn, M.J., van den Berkmortel, F.W., Jansen, R.L., Brandsma, D., Bromberg, J.E., van Heuvel I, Vernhout, R.M., van der Holt, B., van den Bent, M.J. 2014, "Single-agent bevacizumab or lomustine versus a combination of bevacizumab plus lomustine in patients with recurrent glioblastoma (BELOB trial): a randomised controlled phase 2 trial", *The Lancet Oncology*, vol. 15, no. 9, pp. 943-953.
- Tan, Y., Zhang, H., Ma, G.L., Xiao, E.H. & Wang, X.C. 2014, "Peripheral primitive neuroectodermal tumor: dynamic CT, MRI and clinicopathological characteristics--analysis of 36 cases and review of the literature", *Oncotarget*, vol. 5, no. 24, pp. 12968-12977.

- Tang, C., Chua, C.L., Ang, B.T. 2007, "Insights into the cancer stem cell model of glioma tumorigenesis", *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*, vol. 36, no. 5, pp. 352-7.
- Trojanowski, J.Q., Tohyama, T. & Lee, V.M. 1992, "Medulloblastomas and related primitive neuroectodermal brain tumors of childhood recapitulate molecular milestones in the maturation of neuroblasts", *Molecular and Chemical Neuropathology*, vol. 17, no. 2, pp. 121-135.
- Uhrbom, L., Dai, C., Celestino, J.C., Rosenblum, M.K., Fuller, G.N. & Holland, E.C. 2002, "Ink4a-Arf loss cooperates with KRas activation in astrocytes and neural progenitors to generate glioblastomas of various morphologies depending on activated Akt", *Cancer Research*, vol. 62, no. 19, pp. 5551-5558.
- Uhrbom, L., Hesselager, G., Nister, M. & Westermarck, B. 1998, "Induction of brain tumors in mice using a recombinant platelet-derived growth factor B-chain retrovirus", *Cancer Research*, vol. 58, no. 23, pp. 5275-5279.
- Valle, R.D., de Cerio, A.L., Inoges, S., Tejada, S., Pastor, F., Villanueva, H., Gallego, J., Espinos, J., Aristu, J., Idoate, M.A., Andreu, E. & Bendandi, M. 2012, "Dendritic cell vaccination in glioblastoma after fluorescence-guided resection", *World Journal of Clinical Oncology*, vol. 3, no. 11, pp. 142-149.
- Van den Bent, M.J. & Taal, W. 2014, "Are we done with dose-intense temozolomide in recurrent glioblastoma?", *Neuro-Oncology*, vol. 16, no. 9, pp. 1161-1163.
- Veninga, T., Langendijk, H.A., Slotman, B.J., Rutten, E.H., van der Kogel, A.J., Prick, M.J., Keyser, A. & van der Maazen, R.W. 2001, "Reirradiation of primary brain tumours: survival, clinical response and prognostic factors", *Radiotherapy and Oncology*, vol. 59, no. 2, pp. 127-137.
- Vogelstein, B., Kinzler, K.W. 2004, "Cancer genes and the pathways they control", *Nature Medicine*, vol 10, no. 1, pp. 789-799.
- Wang, H., Wang, H., Zhang, W., Huang, H.J., Liao, W.S. & Fuller, G.N. 2004, "Analysis of the activation status of Akt, NFkappaB, and Stat3 in human diffuse gliomas", *Laboratory Investigation*, vol. 84, no. 8, pp. 941-951.
- Watanabe, T., Yokoo, H., Yokoo, M., Yonekawa, Y., Kleihues, P. & Ohgaki, H. 2001, "Concurrent inactivation of RB1 and TP53 pathways in anaplastic oligodendrogliomas", *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, vol. 60, no. 12, pp. 1181-1189.
- Weiss, W.A., Burns, M.J., Hackett, C., Aldape, K., Hill, J.R., Kuriyama, H., Kuriyama, N., Milshteyn, N., Roberts, T., Wendland, M.F., DePinho, R. &

- Israel, M.A. 2003, "Genetic determinants of malignancy in a mouse model for oligodendroglioma", *Cancer Research*, vol. 63, no. 7, pp. 1589-1595.
- Westermarck, B., Heldin, C.H. & Nister, M. 1995, "Platelet-derived growth factor in human glioma", *Glia*, vol. 15, no. 3, pp. 257-263.
- Wick, W., Puduvalli, V.K., Chamberlain, M.C., van den Bent, M.J., Carpentier, A.F., Cher, L.M., Mason, W., Weller, M., Hong, S., Musib, L., Liepa, A.M., Thornton, D.E. & Fine, H.A. 2010, "Phase III study of enzastaurin compared with lomustine in the treatment of recurrent intracranial glioblastoma", *Journal of Clinical*, vol. 28, no. 7, pp. 1168-1174.
- Wickham, T.J., Filardo, E.J., Cheresch, D.A., Nemerow, G.R. 1994, "Integrin alpha v beta 5 selectively promotes adenovirus mediated cell membrane permeabilization", *Journal of Cell Biology*, vol. 127, no. 1, pp. 257-64.
- Wiethoff, C.M., Wodrich, H., Gerace, L. & Nemerow, G.R. 2005, "Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly", *Journal of Virology*, vol. 79, no. 4, pp. 1992-2000.
- Wolter, M., Reifenberger, J., Sommer, C., Ruzicka, T. & Reifenberger, G. 1997, "Mutations in the human homologue of the Drosophila segment polarity gene patched (PTCH) in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system", *Cancer Research*, vol. 57, no. 13, pp. 2581-2585.
- Wong, A.J., Ruppert, J.M., Bigner, S.H., Grzeschik, C.H., Humphrey, P.A., Bigner, D.S. & Vogelstein, B. 1992, "Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 89, no. 7, pp. 2965-2969.
- Wong, E.T., Hess, K.R., Gleason, M.J., Jaeckle, K.A., Kyritsis, A.P., Prados, M.D., Levin, V.A. & Yung, W.K. 1999, "Outcomes and prognostic factors in recurrent glioma patients enrolled onto phase II clinical trials", *Journal of Clinical Oncology*, vol. 17, no. 8, pp. 2572-2578.
- Wrensch, M., Minn, Y., Chew, T., Bondy, M. & Berger, M.S. 2002, "Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature", *Neuro-Oncology*, vol. 4, no. 4, pp. 278-299.
- Xiao, A., Wu, H., Pandolfi, P.P., Louis, D.N. & Van Dyke, T. 2002, "Astrocyte inactivation of the pRb pathway predisposes mice to malignant astrocytoma development that is accelerated by PTEN mutation", *Cancer Cell*, vol. 1, no. 2, pp. 157-168.

- Zheng, H., Ying, H., Yan, H., Kimmelman, A.C., Hiller, D.J., Chen, A.J., Perry, S.R., Tonon, G., Chu, G.C., Ding, Z., Stommel, J.M., Dunn, K.L., Wiedemeyer, R., You, M.J., Brennan, C., Wang, Y.A., Ligon, K.L., Wong, W.H., Chin, L. & DePinho, R.A. 2008, "p53 and Pten control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation", *Nature*, vol. 455, no. 7216, pp. 1129-1133.
- Zhu, H., Acquaviva, J., Ramachandran, P., Boskovitz, A., Woolfenden, S., Pfannl, R., Bronson, R.T., Chen, J.W., Weissleder, R., Housman, D.E. & Charest, A. 2009, "Oncogenic EGFR signaling cooperates with loss of tumor suppressor gene functions in gliomagenesis", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 8, pp. 2712-2716.
- Zhu, Y., Guignard, F., Zhao, D., Liu, L., Burns, D.K., Mason, R.P., Messing, A. & Parada, L.F. 2005, "Early inactivation of p53 tumor suppressor gene cooperating with NF1 loss induces malignant astrocytoma", *Cancer Cell*, vol. 8, no. 2, pp. 119-130.
- Zülch, K.J. 1979, "Histologic typing of tumours of the central nervous system" in World Health Organization, Switzerland.

Anexos

ANEXOS

Anexo I: Tabla de nomenclatura de aminoácidos.

Aminoácido	Código de tres letras	Código de una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutámico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Anexo II: PUBLICACIÓN

RESEARCH ARTICLE

Characterization of the Antiglioma Effect of the Oncolytic Adenovirus VCN-01

Beatriz Vera^{1,2,3}, Naiara Martínez-Vélez^{1,2,3}, Enric Xipell^{1,2,3}, Arlet Acanda de la Rocha^{1,2,3}, Ana Patiño-García^{1,4}, Javier Saez-Castresana^{1,5}, Marisol Gonzalez-Huarriz^{1,2,3}, Manel Cascallo⁶, Ramón Alemany⁷, Marta M. Alonso^{1,2,3*}

1 Navarra's Health Research Institute (IDISNA) Pamplona, Spain, **2** Program in Solid Tumors and Biomarkers, Foundation for the Applied Medical Research, Pamplona, Spain, **3** Dpt of Medical Oncology, University Hospital of Navarra, Pamplona 31008, Spain, **4** Dpt of Pediatrics, University Hospital of Navarra, Pamplona 31008, Spain, **5** Brain Tumor Biology Unit, University of Navarra School of Sciences, 31008 Pamplona, Spain, **6** VCN Biosciences, Sant Cugat del Vallés, 08174 Barcelona, Spain, **7** Translational Research Laboratory, IDIBELL-Institut Catalá d'Oncologia, L'Hospitalet de Llobregat, 08907 Barcelona, Spain

* mmalonso@unav.es



OPEN ACCESS

Citation: Vera B, Martínez-Vélez N, Xipell E, Acanda de la Rocha A, Patiño-García A, Saez-Castresana J, et al. (2016) Characterization of the Antiglioma Effect of the Oncolytic Adenovirus VCN-01. PLoS ONE 11 (1): e0147211. doi:10.1371/journal.pone.0147211

Editor: Vincenzo Cerullo, University of Helsinki, FINLAND

Received: September 14, 2015

Accepted: December 30, 2015

Published: January 25, 2016

Copyright: © 2016 Vera et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by the European Union (Marie Curie IRG270459 to MMA), the Instituto de Salud Carlos III y los Fondos Feder Europeos (P113/125 to MMA), the Spanish Ministry of Science and Innovation (Ramón y Cajal contract RYC-2009-05571 to MMA), The L'OREAL-Unesco Foundation (to MMA), The Department of Health of the Government of Navarra (to MMA), The Basque Foundation for Health Research (BIOEF, BIO13/CI/005) and the Caja Navarra Foundation (to MMA). EX is supported by a fellowship from the Credit Andorra

Abstract

Despite the recent advances in the development of antitumor therapies, the prognosis for patients with malignant gliomas remains dismal. Therapy with tumor-selective viruses is emerging as a treatment option for this devastating disease. In this study we characterize the anti-glioma effect of VCN-01, an improved hyaluronidase-armed pRB-pathway-selective oncolytic adenovirus that has proven safe and effective in the treatment of several solid tumors. VCN-01 displayed a significant cytotoxic effect on glioma cells *in vitro*. *In vivo*, in two different orthotopic glioma models, a single intra-tumoral administration of VCN-01 increased overall survival significantly and led to long-term survivors free of disease.

Introduction

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common primary brain tumor in adults [1]. Multimodal treatment with surgery, radiotherapy, and chemotherapy extends mean survival by only a few months [2] whilst the overall survival after recurrence ranges from 3 to 9 months [3]. Therefore, the need for new therapeutic strategies is evident.

The use of oncolytic adenoviruses in tumour treatment is attractive because these viruses can be produced in high titers, do not integrate into the host chromosome, have a wide tropism, and possess a lytic life cycle that can be exploited for oncolysis [4]. Several selective oncolytic adenoviruses have shown promising results in the treatment of GBM in the preclinical setting [5–8]. However, these viruses encounter a major hurdle which is the distribution within the tumor due to physical limitations. They face transport barriers in the tumor interstitium, due to their size (90–100 nm), much larger than chemotherapeutic drugs and that impairs optimal distribution in solid tumors. The main sources of physical resistance to virus (and drug) transport are the extracellular matrix (ECM) and interstitial fluid, both of which are abundant

Foundation. AAR is supported by a fellowship from Friends of the University of Navarra (ADA). RA is supported by BIO2011-30299-C02-01 from the Spanish Ministry of Education and Science. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. VCN bioscience provided support in the form of salaries or research support for authors MC and RA, but did not have any additional role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The specific roles of these authors are articulated in the 'author contributions' section.

Competing Interests: MC and RA are shareholders of VCN Biosciences. JSC and MMA are PLOS ONE Editors. There are no other competing interests. There are no patents, products in development or marketed products to declare. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

in solid tumors. Of relevance for this work, the high-molecular-weight glycosaminoglycan, hyaluronic acid (HA), makes up a significant portion of the brain extracellular matrix [9,10]

The current study investigates the antiglioma effect adenovirus VCN-01, which is a modified virus based on the ICOVIR platform [11]. We previously showed that ICOVIR-5, a previous version of VCN-01, in which the control of E1A is under an E2F-1 promoter insulated with the myotonic dystrophy locus insulator showed a safe toxicity profile and a robust antiglioma effect [12,13]. The modifications incorporated in VCN-01 are; a selective replication depending on pRB pathway deregulation (for tumor selectivity), a retargeting modification RGDK in the fiber shaft binding (for tumor targeting) and the expression of a modified hyaluronidase (to break down the extracellular matrix). Previously, it has been shown that VCN-01 induces a potent and selective replication profile when delivered systemically, and they demonstrate that the modifications described above improved antitumor efficacy while maintaining a safe toxicity profile [14]. In this work we seek to characterize the antiglioma effect in vivo and in vitro of the oncolytic adenovirus VCN-01. VCN-01 showed a potent oncolytic effect in vitro against a panel of cell lines. Of importance, treatment of two different in vivo orthotopic glioma models with VCN-01 resulted in a significant increase in overall survival and in the number of long-term survivors. Overall, these results encourage further development of VCN-01 against malignant gliomas.

Materials and Methods

Cell lines and culture conditions

Glioma cell lines U87MG, A172, T98G, U251MG, U373MG and SNB19 were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Cell lines were maintained in DMEM/F12 (1:1, v/v) (Gibco, Life Technologies, NY, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C. The adult glioma brain tumor stem cell (BTSC) lines GSC23, GSC11 were kindly provided by Dr. Lang (Department of Neurosurgery; MD Anderson Cancer Center, USA). BTSCs were cultured as neurospheres. The neurospheres were maintained in Dulbecco's modified Eagle/F12 medium (1:1, vol/vol) (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA) supplemented with B27 (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA), basic Fibroblast Growth Factor and Epidermal Growth Factor (20 ng/mL Sigma-Aldrich, St Louis, MO).

Cell viability assay

Cells were seeded in 96-well plates at a density of 1×10^3 cells per well. Cells were infected with VCN-01 on the same day as seeding. VCN-01 construction was carried out as described previously [14]. MOI ranged from 1 to 250. Cell viability was assessed five days later using the MTT assay (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) as described by Mosmann [15]. Dose-response curves were analyzed using CalcuSyn Software (Biosoft, Cambridge, UK). IC₅₀ is the median-effective dose, that is, the dose that causes 50% of cells to be affected, which, in this case, is equivalent to the dose that results in 50% survival.

Quantitative RT-PCR of mRNA levels

Quantitative RT-PCR was performed with ABI Prism-7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The primers used for detection of hyaluronidase PH20 and Fiber mRNA transcripts were:

- PH20 forward primer: 5'- CTTAGTCTCACAGAGGCCAC-3'

- PH20 reverse primer: 5'- CCAGGAGCAAGGAGTGTGTA-3'
- Fiber forward primer: 5'- ATTTGCCACATCCTCTTACAC -3'
- Fiber reverse primer: 5' CAAACGCTGTTGGATTTATG -3'

The cycling conditions for PCR were one cycle of 10 minutes at 95°C followed by 15s at 95°C, 1 minute at 60°C for 40 cycles. To determine relative gene expression, the comparative threshold cycle (C_T) method was used [16].

Western Blot analysis

Whole-cell lysate protein samples were resolved by SDS-PAGE, electro-blotted to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and incubated with the following antibodies: rabbit anti-E1A (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and mouse anti-Fiber (Thermo Scientific, MA, USA) and GRB2 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).

Viral replication assays

Cell cultures were grown to 60–80% confluence in 24-well plates and subsequently infected at an MOI that allowed at least 80% infectivity. On day 4 after infection cells and medium were harvested and freeze–thawed three times. Viral titers in cell extracts were determined according to an anti-hexon staining-based method [17].

Animal studies

In order to assess the anti-glioma effect of VCN-01 *in vivo* we used two different glioma mouse models. The first one is the well-established U87 MG model. The other model uses the BTSC GSC23 cell line, which develops infiltrative and diffuse tumors that reflect the phenotype of gliomas in human patients.

Ethical approval for animal studies was granted by the Animal Ethical Committee of the University of Navarra (CEEA; Comité Etico de Experimentación Animal under the protocol number CEEA/069-13). All animal studies were done in the veterinary facilities of the Center for Applied Medical Research in accordance with institutional, regional, and national laws and ethical guidelines for experimental animal care. The animals were monitored on daily basis and were euthanized when they demonstrate moribund behavior including: slight head tilt, hemiparesis, hunched posture, scleral edema, inability to access food/water, weight loss >20% of baseline, and excessive tumor burden as indicated by doming of cranium >0.5 cm, or if show signs of lower extremity weakness. The animals were sacrificed with CO₂ inhalation. To minimize suffering of the animals, ketamine/xylazine or buprenorphine was given for signs of pain, eye wincing, hunched state with front limbs over the head.

Nude (*nu/nu*) mice were obtained from Taconic Farms Inc. U87 MG (5×10^5) and GSC23 cells (3×10^5) were engrafted into the caudate nucleus of athymic mice by means of the guide-screw system described by [18]. On the third day after implantation of tumour cells, tumours were injected with 5- μ L of PBS, VCN-01 inactivated with UV light or VCN-01 solution: 10 mice received PBS, 10 mice received VCN-01 at 1×10^8 pfu/mouse previously inactivated with UV (UVi), 10 mice received VCN-01 at a concentration of 1×10^7 pfu/mouse, and 10 mice received VCN-01 at 1×10^8 pfu/mouse).

Immunohistochemical analysis

Tumor xenografts and paraffin-embedded sections of mouse tumors were treated goat anti-hexon antibody (Chemicon, CA, USA). For immunohistochemical staining, Vectastain ABC kits (Vector Laboratories, CA, USA) were used according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

For the *in vitro* experiments, data are expressed as mean \pm SD, and comparisons were by the two-tailed Student *t* test. The *in vivo* cytopathic effect of VCN-01 on human glioma xenografts was assessed by plotting survival curves according to the Kaplan-Meier method. Survival in different treatment groups was compared using the log-rank test.

Results

VCN-01 exerts a potent antitumor effect in established and brain tumor stem cell lines

To examine the anti-glioma effect of the oncolytic adenovirus VCN-01 we performed viability assays in a battery of established glioma cell lines (U87-MG, A172, T98G, U251-MG, U373, and SNB19) and brain tumor stem cells (BTSC, GSC23, and NSC11) and also in the murine glioma GL261. We choose the GL261 as a possible resistant cell line since adenovirus replication is compromised in murine cell lines. All the glioma cell lines tested were susceptible to the cytotoxic effect of VCN-01. MOI IC₅₀ ranged from 0.88 \pm 0.12 to 213 \pm 18. U87-MG was the most sensitive cell line, and GSC23 the most resistant (Fig 1). As expected BTSC lines were more resistant than established glioma cell lines at a similar or higher level than the virus resistant GL261 cell line. Dose-response cytotoxicity was observed in all cell lines.

VCN-01 replicates efficiently *in vitro*

Replication was assessed by characterization of the expression of early and late adenoviral proteins. E1A is expressed immediately after infection and initiates the viral replication cycle [19]. Fiber is a protein component of the capsid, it is expressed late in the replication process, and it is thereby indicative of an effective viral replication cycle. Cells were infected at either 1 or 10 MOIs and protein expression was assessed 48 hours later. We observed a robust and dose dependent expression of both E1A and Fiber proteins in all the cell line tested (Fig 2A) except in the GL261 cell line where, as expected, fiber expression was absent. In addition, we observed E1A and Fiber expression differences amongst the cell lines used suggesting differences in the susceptibility to the virus effect. Next, we were interested in assess whether the hyaluronidase (PH20) protein was being efficiently expressed by VCN-01. Analyses of PH20 mRNA expression in all the cell lines used in this study (except GL261) showed a consistent mRNA expression that was virus-dose dependent (Fig 2B). The expression of PH20 mRNA correlated with the expression of Fiber (Fig 2B), suggesting similar kinetics.

Finally, quantification of VCN-01 replication and comparison of replication in cells infected with 1 MOI or 10 MOI indicated that VCN-01 replicated effectively in all the cell lines tested (Fig 2C). Replication was less effective in the BTSC lines, GSC23 and GSC11. Viral replication was up to ten-fold higher in cells infected at a MOI of ten as compared to those at a MOI of one. We also assessed the replication of VCN-01 in GL261 cell line and as expected we did not observed any replication even at the highest dose used (300 MOIs) when compared with the control (VCN-01 infected cells at 300 MOIs at 4 hours) (Fig 2D).

In conjunction, these results indicate that the virus infects and replicates effectively in glioma cell lines. Moreover, *in vitro*, the virus expresses PH-20.

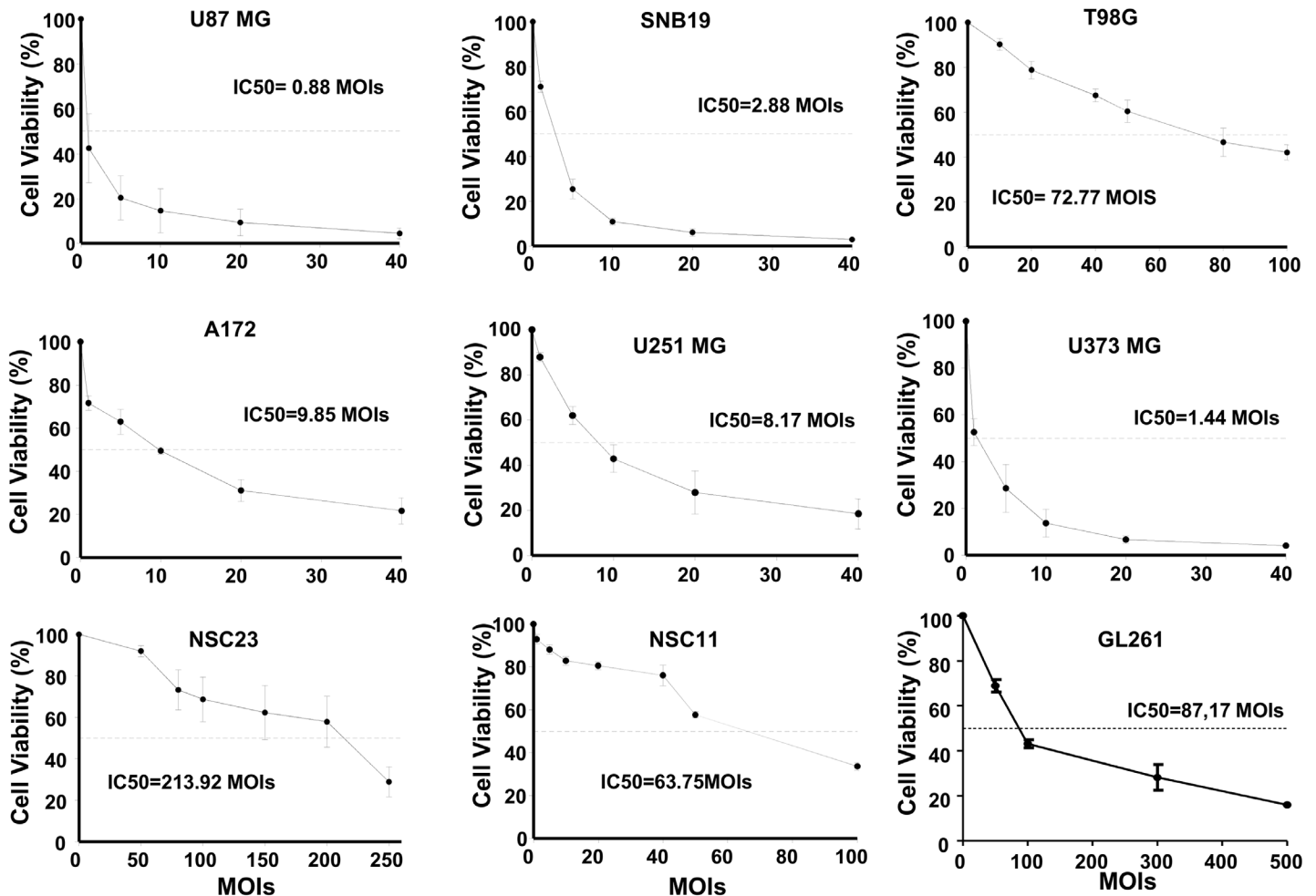


Fig 1. VCN-01 exerts a potent antitumor effect in established and brain tumor stem cell lines. (A) Cell viability analyses of VCN-01 infected glioma cell lines. Cell viability was assessed using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assays five days after infection. Data are shown as the percentage (mean \pm SD) of cells alive after infection with VCN-01 at the indicated multiplicities of infection (MOIs) relative to cells infected with UV-inactivated VCN-01 (control, equal to 100%).

doi:10.1371/journal.pone.0147211.g001

VCN-01 treatment results in a significant antitumor effect in two orthotopic glioma models

Mice bearing U87 MG or GSC23 intracranial xenografts were given intratumorally a single injection of PBS (control), VCN-01 inactivated with UV (VCN-UVi 1×10^8 pfu/mouse) VCN-01 (1×10^7 pfu/mouse) or VCN-01 (1×10^8 pfu/mouse). The median survival for mice that received PBS or the virus inactivated with UV was 34/32 and 63 days, for U87 MG and NSC-23 mice, respectively. In contrast, the median survival of mice treated with VCN-01 at 1×10^7 pfu were 86 and 85.5 days, for U87 MG and GSC23 mice, respectively. All U87-MG mice injected with PBS or UV-inactivated virus died by day 39, and all GSC23 mice injected with PBS or UV-inactivated virus died by day 70. Meanwhile, 80% of mice (both models pooled) whose tumours were injected with 1×10^8 pfu of VCN-01 were alive at 90 days (Fig 3A).

Hematoxylin and eosin (H&E) staining revealed large, aggressive tumours in PBS control mice while mice that received 10^7 pfu VCN-01 had smaller tumours with extensive necrotic areas surrounded by areas displaying prominent viral inclusion bodies suggestive of effective

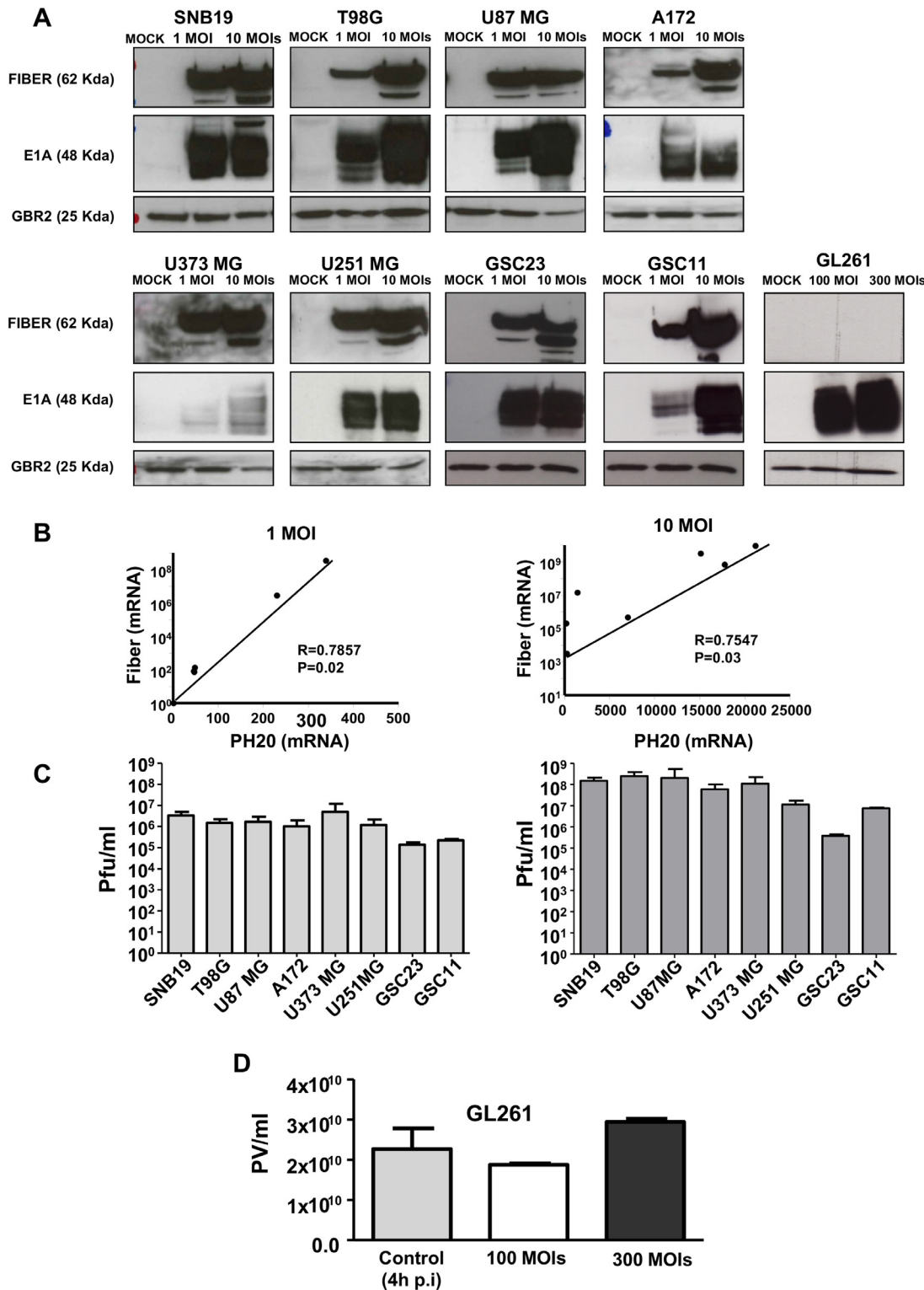


Fig 2. VCN-01 replicates efficiently in glioma cell lines *in vitro*. (A) The expression amounts of Fiber and E1A proteins in human glioblastoma were determined by Western blot analysis. Note that the levels were viral dose-dependent in all the cell lines. (B) The expression of Fiber and PH20 mRNA in all the cell lines were determined by real time PCR; expression of both genes was correlated, suggesting similar kinetics and dose-dependency. The cell lines used were SNB19, T98G, U87 MG, A172, U373 MG, U251 MG, GSC23 and GSC11. (C) The quantification of VCN-01 viral replication in all the cell lines. Human glioblastoma cells were infected with two dilutions of VCN-01 (1 MOI and 10 MOIs). The virus replicated up to ten-times better in the cells infected

with 10 MOIs, which demonstrates that the virus infected and replicated efficiently in glioblastoma cell lines *in vitro*. (D) The quantification of VCN-01 viral replication in GL261 murine cell line. GL261 cells were infected with two dilutions of VCN-01 (100 MOI and 300 MOIs). As a control for the replication we used cells infected with VCN-01 at 300 MOIs and collected 4 hours after infection, during this time the virus does not have time to replicate indicating the initial viral particles.

doi:10.1371/journal.pone.0147211.g002

viral infection and replication (Fig 3B). These latter areas typically stained for hexon proteins (Fig 3C). Immunohistochemical studies of the brains of long-term survivors (of both U87 MG and GSC-23 mice) showed no evidence of residual tumor; there was no staining with anti-hexon antibodies, indicating an absence of viral particles (Fig 3C). In addition, we assessed the expression of hyaluronic acid in the different treatment groups and compare it with the expression of hexon. Brains from control animals showed a uniform hyaluronic acid staining throughout the tumor and the brain. Meanwhile in VCN-01 treated animals we could observed that in areas surrounding hexon staining there was less hyaluronic acid staining suggesting the effect of the hyaluronidase enzyme (Fig 3D; representative images from GSC23 bearing mice).

In summary, a single intra-tumoral injection of VCN-01 resulted in significant improvement in survival in two different mouse models for glioma. These data suggest that VCN-01 may be a promising therapeutic agent for glioma.

Discussion

GBM is an aggressive tumor whose progression current therapies only manage to delay by a few months. In the preclinical glioma study reported here, we characterize the anti-tumor effect of VCN-01, a new generation oncolytic adenovirus developed by genetic modification from the ICOVIR platform [14]. We found VCN-01 to induce a potent antitumor effect *in vitro* and *in vivo*, and we therefore consider this virus to be a promising potential treatment for gliomas.

VCN-01 replication is engineered to require the existence of free E2F and is therefore dependent on pRB pathway deregulation. Overexpression of E2F1 protein and the activation of E2F-responsive promoters have been reported, by our group and others, to occur in gliomas [20,21] and consequently, VCN-01 replication is expected to proceed in glioma cells. This expectation was confirmed in the current study.

Several years ago our group published results of a study into the antiglioma effect of a precursor of VCN-01, ICOVIR-5, which combines E1a transcriptional control by an insulated form of the E2F promoter with the Delta24 mutation of E1a. ICOVIR-5 has also the Kozak sequence at the E1a start codon, and this sequence is important to restore E1a expression and viral replication to AdwtRGD levels in tumor cells. ICOVIR-5 proved to be a highly selective vector in glioblastoma preclinical models [12] and non-toxic to the model animal when administered systemically [13]. The drawback, however, was that ICOVIR-5 was less potent than the same adenovirus without the E2F promoter. In contrast, VCN-01 is not only a safe vector when delivered systemically but has a significant antitumoral effect in different solid tumors [14].

In the current *in vivo* study, we used two different tumour models: a U87MG-based model, which is aggressive but does not reflect the infiltrative phenotype of GBM; and a GSC23 model, which is a BTSC line and gives rise to extremely aggressive and invasive tumours. Even with GSC23-derived tumours, VCN-01 demonstrated effective antitumor activity with a single injection.

Our study does not compare VCN-01 with other viruses, such as ICOVIR-5, and therefore it remains a matter of speculation whether the enhanced antitumor effect is due to the improved infectivity plus the expression of a soluble hyaluronidase (PH20). Another consideration not covered by our study is the effect of VCN-01 in an immunocompetent model. It has

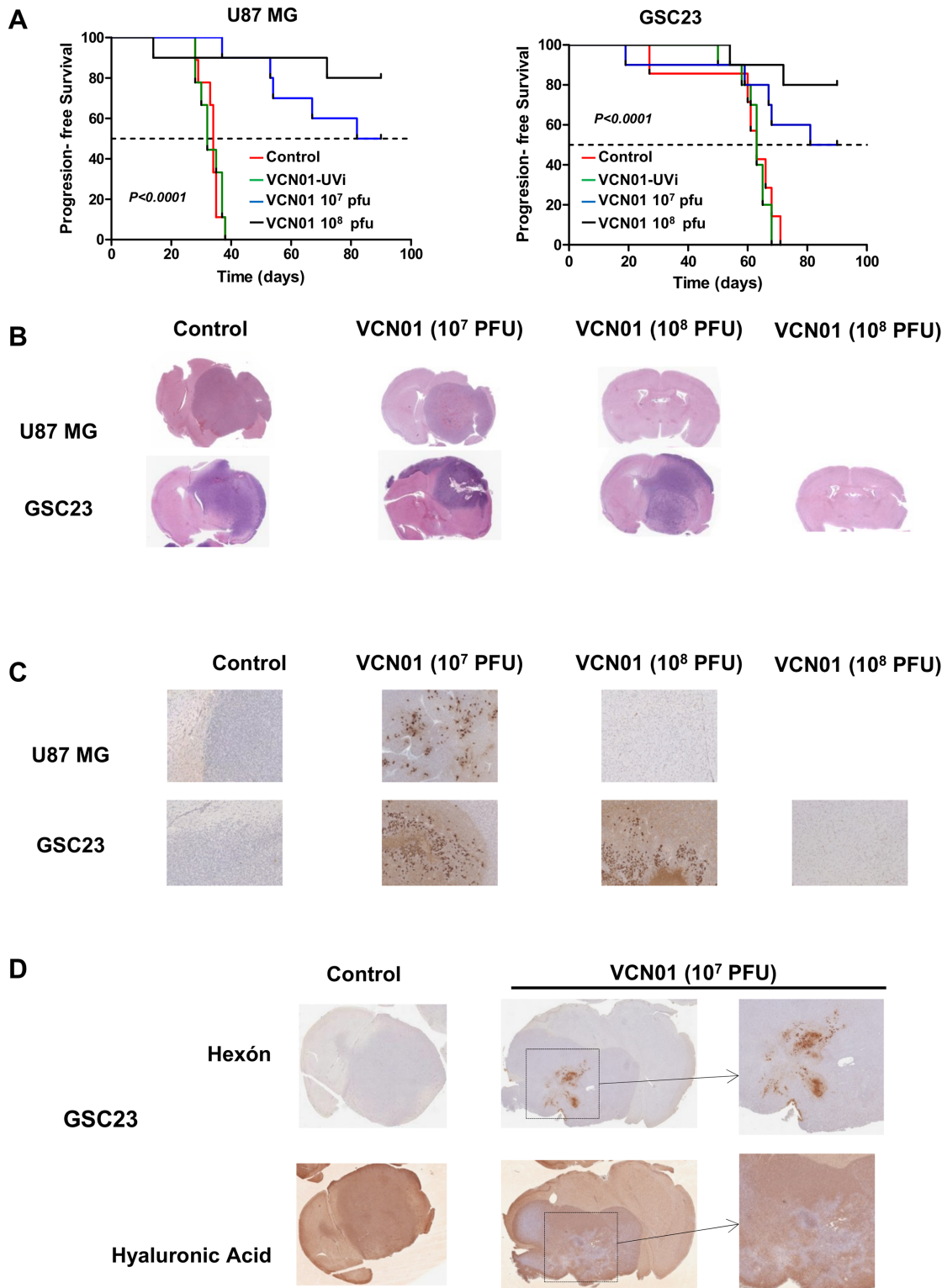


Fig 3. VCN-01 treatment results in a significant antitumor effect in two different *in vivo* glioma models. (A) Kaplan-Meier survival curves for overall survival in VCN-01 (10⁷ pfu), VCN (10⁸ pfu) and control (PBS)-treated athymic mice bearing U87 MG and GSC23 intracranial xenografts. Intracranial implantation of U87 MG or GSC23 cells (day 0) was followed by one intratumoral injection (on day 3) of VCN-01 (10⁷ pfu; *n* = 10), VCN-01 (10⁸ pfu; *n* = 10), VCN-01 10⁸ pfu UV inactivated (VCN01-UVi; *n* = 10) or PBS (control; *n* = 10). The *P* values were determined by the log-rank test and represent a comparison of survival of VCN-01-treated mice with that of mice treated with PBS. (B) Hematoxylin and eosin staining of cross sections of U87 MG or GSC23 xenografts

treated with PBS or VCN-01. (C) Hexon immunostaining of the brains of animals treated with VCN-01 (10^7 pfu), VCN (10^8 pfu) or control (PBS). The tissue sections were incubated with anti-hexon antibodies. The magnification of histo-chemical images is $\times 20$. (D) Representative Hyaluronic acid and hexon immunostaining of the brains of animals bearing GSC23 cell line treated with VCN-01 (10^7 pfu), or control (PBS). The tissue sections were incubated with anti-hyaluronic acid and hexon antibodies. The magnification of histo-chemical images is $\times 20$.

doi:10.1371/journal.pone.0147211.g003

been speculated that the antitumor effect of oncolytic viruses is due not only to the intrinsic cytolytic effect of the virus but also to the triggering of an immune response against the virus and in turn against the tumoral cells hosting that virus. In this respect, it is interesting to note that hyaluronidase is known to be immunogenic [22–26].

In conclusion, *in vitro*, VCN-01 effectively infected cells and replicated in glioma cell lines, significantly reducing tumor growth. *In vivo*, a single intra-tumoral injection of VCN-01 resulted in significant ($P < 0.0001$) improvement in survival in two different mouse models for glioma. These preclinical results suggest that VCN-01 warrants further study to evaluate its potential in the treatment of malignant gliomas.

Acknowledgments

We thank David Burdon for editorial assistance.

This work was supported by the European Union (Marie Curie IRG270459 to MMA), the Instituto de Salud Carlos III y los Fondos Feder Europeos (PI13/125 to MMA), the Spanish Ministry of Science and Innovation (Ramón y Cajal contract RYC-2009-05571 to MMA), The L'OREAL-Unesco Foundation (to MMA), The Department of Health of the Government of Navarra (to MMA), The Basque Foundation for Health Research (BIOEF, BIO13/CI/005) and the Caja Navarra Foundation (to MMA). EX is supported by a fellowship from the Credit Andorra Foundation. AAR is supported by a fellowship from Friends of the University of Navarra (ADA). RA is supported by BIO2011-30299-C02-01 from the Spanish Ministry of Education and Science.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: BV MMA APG. Performed the experiments: BV EX NMV AAR MGH. Analyzed the data: BV EX NMV APG JSC MMA. Contributed reagents/materials/analysis tools: RA MC. Wrote the paper: BV MMA.

References

1. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.* 2007; 21: 2683–2710. PMID: [17974913](#)
2. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 2009; 10: 459–466. doi: [10.1016/S1470-2045\(09\)70025-7](#) PMID: [19269895](#)
3. Ballman KV, Buckner JC, Brown PD, Giannini C, Flynn PJ, LaPlant BR, et al. The relationship between six-month progression-free survival and 12-month overall survival end points for phase II trials in patients with glioblastoma multiforme. *Neuro Oncol.* 2007; 9: 29–38. PMID: [17108063](#)
4. Alemany R. Cancer selective adenoviruses. *Mol Aspects Med.* 2007; 28: 42–58. PMID: [17300834](#)
5. Alonso MM, Gomez-Manzano C, Bekele BN, Yung WK, Fueyo J. Adenovirus-based strategies overcome temozolomide resistance by silencing the O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter. *Cancer Res.* 2007; 67: 11499–11504. PMID: [18089777](#)
6. Ulasov IV, Tyler MA, Zhu ZB, Han Y, He TC, Lesniak MS. Oncolytic adenoviral vectors which employ the survivin promoter induce glioma oncolysis via a process of beclin-dependent autophagy. *Int J Oncol.* 2009; 34: 729–742. PMID: [19212678](#)

7. Jiang H, Gomez-Manzano C, Aoki H, Alonso MM, Kondo S, McCormick F, et al. Examination of the therapeutic potential of Delta-24-RGD in brain tumor stem cells: role of autophagic cell death. *J Natl Cancer Inst.* 2007; 99: 1410–1414. PMID: [17848677](#)
8. Fueyo J, Alemany R, Gomez-Manzano C, Fuller GN, Khan A, Conrad CA, et al. Preclinical characterization of the anti glioma activity of a tropism-enhanced adenovirus targeted to the retinoblastoma pathway. *J Natl Cancer Inst.* 2003; 95: 652–660. PMID: [12734316](#)
9. Baier C, Baader SL, Jankowski J, Gieselmann V, Schilling K, Rauch U, et al. Hyaluronan is organized into fiber-like structures along migratory pathways in the developing mouse cerebellum. *Matrix Biol.* 2007; 26: 348–358. PMID: [17383168](#)
10. Bellail AC, Hunter SB, Brat DJ, Tan C, Van Meir EG. Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36: 1046–1069. PMID: [15094120](#)
11. Majem M, Cascallo M, Bayo-Puxan N, Mesia R, Germa JR, Alemany R. 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 Ther.* 2006; 13: 696–705. PMID: [16498429](#)
12. Alonso MM, Cascallo M, Gomez-Manzano C, Jiang H, Bekele BN, Perez-Gimenez A, et al. ICOVIR-5 shows E2F1 addiction and potent anti glioma effect in vivo. *Cancer Res.* 2007; 67: 8255–8263. PMID: [17804740](#)
13. Cascallo M, Alonso MM, Rojas JJ, Perez-Gimenez A, Fueyo J, Alemany R. Systemic toxicity-efficacy profile of ICOVIR-5, a potent and selective oncolytic adenovirus based on the pRB pathway. *Mol Ther.* 2007; 15: 1607–1615. PMID: [17579575](#)
14. Rodriguez-Garcia A, Gimenez-Alejandro M, Rojas JJ, Moreno R, Bazan-Peregrino M, Cascallo M, et al. Safety and efficacy of VCN-01, an oncolytic adenovirus combining fiber HSG-binding domain replacement with RGD and hyaluronidase expression. *Clin Cancer Res.* 2015; 21: 1406–1418. doi: [10.1158/1078-0432.CCR-14-2213](#) PMID: [25391696](#)
15. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65: 55–63. PMID: [6606682](#)
16. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008; 3: 1101–1108. PMID: [18546601](#)
17. Cascallo M, Gros A, Bayo N, Serrano T, Capella G, Alemany R. Deletion of VAI and VAI1 RNA genes in the design of oncolytic adenoviruses. *Hum Gene Ther.* 2006; 17: 929–940. PMID: [16972761](#)
18. Lal S, Lacroix M, Tofilon P, Fuller GN, Sawaya R, Lang FF. An implantable guide-screw system for brain tumor studies in small animals. *J Neurosurg.* 2000; 92: 326–333. PMID: [10659021](#)
19. Berk AJ. Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus. *Oncogene.* 2005; 24: 7673–7685. PMID: [16299528](#)
20. Alonso MM, Fueyo J, Shay JW, Aldape KD, Jiang H, Lee OH, et al. Expression of transcription factor E2F1 and telomerase in glioblastomas: mechanistic linkage and prognostic significance. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97: 1589–1600. PMID: [16264179](#)
21. Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell.* 2002; 2: 103–112. PMID: [12204530](#)
22. Chiarella P, De Santis S, Fazio VM, Signori E. Hyaluronidase contributes to early inflammatory events induced by electrotransfer in mouse skeletal muscle. *Hum Gene Ther.* 2013; 24: 406–416. doi: [10.1089/hum.2012.215](#) PMID: [23360544](#)
23. Horton MR, Shapiro S, Bao C, Lowenstein CJ, Noble PW. Induction and regulation of macrophage metalloelastase by hyaluronan fragments in mouse macrophages. *J Immunol.* 1999; 162: 4171–4176. PMID: [10201943](#)
24. Hodge-Dufour J, Noble PW, Horton MR, Bao C, Wysoka M, Burdick MD, et al. Induction of IL-12 and chemokines by hyaluronan requires adhesion-dependent priming of resident but not elicited macrophages. *J Immunol.* 1997; 159: 2492–2500. PMID: [9278343](#)
25. Horton MR, McKee CM, Bao C, Liao F, Farber JM, Hodge-DuFour J, et al. Hyaluronan fragments synergize with interferon-gamma to induce the C-X-C chemokines mig and interferon-inducible protein-10 in mouse macrophages. *J Biol Chem.* 1998; 273: 35088–35094. PMID: [9857043](#)
26. Horton MR, Burdick MD, Strieter RM, Bao C, Noble PW. Regulation of hyaluronan-induced chemokine gene expression by IL-10 and IFN-gamma in mouse macrophages. *J Immunol.* 1998; 160: 3023–3030. PMID: [9510207](#)