



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **META-ANÁLISIS DE LA LITERATURA CIENTÍFICA SOBRE LOS MÉTODOS Y TÉCNICAS UTILIZADAS PARA APLICAR VIRUS ONCOLÍTICOS EN ANIMALES O HUMANOS PARA TRATAMIENTO DEL CÁNCER**

Miguel Andrés López Baquero

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Maestría en Bioquímica

Bogotá

2017

# **META-ANÁLISIS DE LA LITERATURA CIENTÍFICA SOBRE LOS MÉTODOS Y TÉCNICAS UTILIZADAS PARA APLICAR VIRUS ONCOLÍTICOS EN ANIMALES O HUMANOS PARA TRATAMIENTO DEL CÁNCER**

Miguel Andrés López Baquero

Proyecto de tesis presentado como requisito parcial para optar al título de  
**Magister en Bioquímica**

Director:  
Carlos Arturo Guerrero Fonseca MD. MSc. PhD.

Línea de investigación:  
Virus Oncolíticos

Grupo de investigación:  
Biología Molecular de virus

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Maestría en Bioquímica

Bogotá

2017

## **DEDICATORIA**

**A Dios**

**A mi madre Consuelo**

**A la memoria de mi abuela Paulina**

**A la memoria de mi amigo Jose Luis**

# RESUMEN

El cáncer es responsable de un tercio de las muertes prematuras por enfermedades no transmisibles a nivel mundial, por lo que se ha convertido en una enfermedad de salud pública, esto ha generado que se busquen nuevas alternativas para su prevención, diagnóstico y tratamiento.

La terapia con virus oncolíticos es un nuevo tipo de tratamiento que promueve la respuesta antitumoral a través de causar la muerte selectiva de células tumorales sin lesionar tejido normal, e inducir la respuesta inmune sistémica antitumoral

Aunque varios ensayos realizan la administración intratumoral del virus, en el caso de pacientes con metástasis se requiere una administración sistémica, sin embargo la neutralización por factores séricos y órganos como el bazo e hígado son barreras que pueden impedir alcanzar el umbral virémico, el cual es necesario para la infección de focos tumorales y consecuente efectividad en el tratamiento oncolítico. Por lo cual recientes estudios están enfocados en superar las barreras anteriormente mencionadas y promover la permeabilidad del endotelio vascular para facilitar el desplazamiento de los virus a los focos tumorales.

El objetivo de este trabajo es analizar la literatura científica sobre los métodos y técnicas utilizadas para aplicar virus oncolíticos en animales o humanos para tratar el cáncer.

La metodología usada fue por medio de una búsqueda sistemática de literatura original y de revisión publicada entre 1990 y 2016 sobre métodos o técnicas utilizadas para el tratamiento del cáncer en animales o humanos mediante el uso de virus oncolíticos. Para esto se utilizaron plataformas de búsqueda como clinicaltrials.gov, y bases de datos como Pubmed, Jstor, Ebsco, utilizando las palabras claves “oncolytic virus”, “application oncolytic virus”, “Therapy oncolytic virus”, “oncolytic immunotherapy”, “viral oncotherapy”, “tumour targeting”, “viral vector cancer therapy”.

Los resultados de la búsqueda se agruparon en los métodos usados para la aplicación de virus oncolíticos en animales o humanos; los cuales fueron: células transportadoras, encapsulación por liposomas y polímeros, ultrasonido, coadyuvantes, terapia fotodinámica, ingeniería genética y microRNAs

Las conclusiones de este estudio mostraron que los sistemas de transporte son eficaces para evitar la respuesta inmune del huésped contra el virus; que la ingeniería genética es la técnica más usada en estudios con virus oncolíticos y que la combinación de varias metodologías es lo que ha mostrado mayor respuesta terapéutica con virus oncolíticos.

### **Palabras clave**

Cáncer, respuesta inmune, virus oncolíticos, encapsulación, miRNAs.

# ABSTRACT

Cancer is responsible for one third of premature deaths due to non-transmissible diseases worldwide; it has become a public health disease. This has promoted new alternatives for its prevention, diagnosis and treatment.

Oncolytic virus therapy is a new type of treatment that promotes the antitumor response by causing selective death of tumor cells without damaging normal tissue and inducing the antitumor systemic immune response.

Although several trials perform intratumoral administration of virus, in patients with metastases a systemic administration is required. However neutralization by serum factors and organs such as the spleen and liver are barriers that can prevent reaching the viremic threshold, which is necessary for infection of tumor foci and consequent effectiveness in oncolytic treatment. Therefore, recent studies are focused on overcoming the aforementioned barriers and promoting the permeability of vascular endothelium to facilitate the virus displacement to tumor foci.

The objective of this work is to analyze the scientific literature about methods and techniques used to apply oncolytic viruses in animals or humans to treat cancer.

The methodology used was a systematic search of original literature and review published between 1990 and 2016 about methods or techniques used to treat cancer in animals or humans through the use of oncolytic viruses. For this, search platforms such as clinicaltrials.gov, and databases such as Pubmed, Jstor, Ebsco, were used, using the keywords "oncolytic virus", "application oncolytic virus", "Therapy oncolytic virus", "oncolytic immunotherapy", "viral oncotherapy", "tumour targeting", "viral vector cancer therapy".

The results of this search were grouped into methods used for the application of oncolytic viruses in animals or humans; which were: transporting cells, encapsulation by liposomes and polymers, ultrasound, adjuvants, photodynamic therapy, genetic engineering and microRNAs

The conclusions of this study showed that transport systems are effective to avoid the host immune response against the virus; genetic engineering is the most used technique in studies with oncolytic viruses and the combination of several methodologies has shown

the greatest therapeutic response with oncolytic viruses.

## **Keywords**

Cancer, immune response, oncolytic viruses, encapsulation, miRNAs.

# CONTENIDO

	Pag
Lista de símbolos y abreviaturas .....	9
Lista de figuras y tablas.....	10
Introducción .....	11
<b>1. Marco Teórico.....</b>	<b>14</b>
1.1 Virus Oncolíticos.....	14
1.1.1 Adenovirus.....	16
1.1.2 Coxsackievirus.....	18
1.1.3 Herpes virus.....	20
1.1.4 Measles virus.....	22
1.1.5 Newcastle Disease virus.....	23
1.1.6 Parvovirus.....	24
1.1.7 Poliovirus.....	26
1.1.8 Reovirus.....	27
1.1.9 Vaccinia virus.....	30
1.1.10 Vesicular Stomatitis virus.....	32
<b>2. Preguntas de Investigación.....</b>	<b>34</b>
<b>3. Formulación del problema.....</b>	<b>34</b>
<b>4. Justificación.....</b>	<b>35</b>
<b>5. Objetivos.....</b>	<b>36</b>
5.1 Objetivo General.....	¡Error! Marcador no definido.6
5.2 Objetivos Específicos.....	¡Error! Marcador no definido.6
<b>6. Materiales y Métodos.....</b>	<b>37</b>
<b>7. Resultados.....</b>	<b>¡Error! Marcador no definido.8</b>
7.1 Métodos para aplicación de virus.....	¡Error! Marcador no definido.8
7.1.1 Células Transportadoras.....	38
7.1.2 Encapsulación: Lipsosmas y polímeros.....	41
7.1.3 Ultrasonido.....	45
7.1.4 Coadyuvantes.....	47
7.1.5 Terapia fotodinámica.....	51
7.1.6 Ingeniería Genética.....	52
7.1.7 microRNAs.....	56
<b>8. Discusión.....</b>	<b>¡Error! Marcador no definido.8</b>
<b>9. Conclusiones.....</b>	<b>62</b>
<b>A. Anexo: Resultados de Búsqueda en Bases de Datos.....</b>	<b>63</b>
<b>10. Bibliografía.....</b>	<b>67</b>



# LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

**VOs:** Virus Oncolíticos  
**Ads:** Adenovirus  
**HSV:** Herpes Simplex Virus  
**VV:** Vaccinia Virus  
**NDV:** Virus de la enfermedad de Newcastle  
**MV:** Measles Virus  
**PVS:** Polio Virus  
**PSA:** Antígeno específico de próstata (Prostate Specific Antigen)  
**GM-CSF:** Factor estimulante de colonias granulocitos macrófago (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor)  
**EGFR:** Receptor del factor de crecimiento epidermal (epidermal growth factor receptor).  
**RNA:** Ácido ribonucleico  
**PFU:** Unidades formadoras de placa  
**DL:** Dosis letal  
**NSP:** Proteína no estructural.  
**IRF:** Factor regulador de interferón  
**RNA<sub>m</sub>:** RNA mensajero.  
**aa :** aminoácidos  
**NLS:** Secuencia conservada de localización nuclear (Nuclear Localization Sequence)  
**NES:** Secuencia de exportación nuclear (Nuclear Export Signal)  
**TNF $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral  $\alpha$   
**IL:** Interleukina  
**TCR:** Receptores tipo Toll (Toll Like Receptor)  
**COX-2:** Ciclooxygenasa 2  
**DNA:** Ácido desoxirribonucleico  
**PDI:** Proteína disulfuro isomerasa  
**DMEM:** Dulbecco's modified Eagle's médium  
**h.p.i:** Horas postinfección  
**RRV:** Rotavirus de mono Rhesus.  
**TRUY:** Aislamiento rotaviral producto de mezclar las cepas TRF, RRV, UK y YM  
**WWM:** Aislamiento rotaviral producto de mezclar las cepas Wa, Wi y M69.  
**Wt1-5:** Aislamiento rotaviral producto de mezclar las cepas TRF, RRV, UK y YM.  
**WTEW:** Aislamiento rotaviral producto de mezclar las cepas WWM, TRUY, ECwt y Wt1-5.  
**ECwt:** Cepa de rotavirus murino.  
**SFB:** Suero fetal bobino  
**PBS:** Buffer fosfato salino.  
**IgG:** Inmunoglobulina G  
**PI3K:** Phosphoinositide 3 Kinase  
**EGF:** factor de crecimiento epidermal.  
**HSPs:** Proteínas de choque térmico.  
**TNFR1:** TNF Receptor 1  
**ATP:** Adenosine Triphosphate  
**HT29:** Línea celular de adenocarcinoma colorectal de humano  
**PC3:** Línea celular de adenocarcinoma grado IV de próstata  
**MCF-7:** Línea celular de adenocarcinoma de seno/glándula mamaria.

# LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

**Figura 1:** Estructura del adenovirus

**Figura 2:** Estructura del Coxsackievirus

**Figura 3:** Estructura del Herpes virus

**Figura 4:** Estructura del Measles virus

**Figura 5:** Estructura del NDV

**Figura 6:** Estructura del Parvovirus

**Figura 7:** Estructura del Poliovirus

**Figura 8:** Estructura y replicación del Reovirus

**Figura 9:** Estructura del Vaccinia virus

**Figura 10:** Estructura del VSV

**Figura 11:** Esquema del ensayo clínico

**Figura 12:** Supervivencia de modelos murinos según tratamiento administrado.

**Figura 13:** Tamaño tumoral y supervivencia de modelos murinos según tratamiento administrado

**Figura 14:** Sobrevida y volumen tumoral de modelos murinos según tratamiento administrado.

**Figura 15:** Microscopia electrónica 24 horas post-infección oncoviral de células A549.

**Figura 16:** Mecanismos de sonoporación por microburbujas

**Figura 17:** Porcentaje de supervivencia de ratas según el tratamiento aplicado

**Figura 18:** Esquema de tratamiento y sobrevida de los modelos murinos por tratamiento administrado

**Figura 19:** Esquema de tratamiento, volumen tumoral y supervivencia de modelos murinos según tratamiento

**Figura 20:** Representación del proceso de evolución dirigida

**Tabla 1:** Virus Oncolíticos en Ensayos Clínicos

**Tabla 2:** Resultado de búsqueda en bases de datos

# INTRODUCCIÓN

El cáncer es la principal causa de muerte tanto en países industrializados como en países en vía de desarrollo, se espera que la carga de la enfermedad siga en aumento por el continuo crecimiento de la población y el envejecimiento de la misma; especialmente en países en vías de desarrollo, pues cerca del 82% de la población mundial reside en ellos.

El cáncer es responsable de 1 de cada 3 muertes prematuras por enfermedades no transmisibles a nivel mundial, se espera que para 2030 se diagnostiquen a más de 20 millones de personas (1).

Al convertirse el cáncer en una enfermedad de salud pública, se está en busca nuevas alternativas para su prevención, diagnóstico y tratamiento; para este último ámbito; uno de los campos de investigación promisorios es la terapia con virus oncolíticos, la cual en algunos países ya se usa como nueva clase de inmunoterapia para el cáncer.

La terapia con virus oncolíticos es un nuevo tipo de tratamiento que promueve la respuesta antitumoral a través de causar la muerte selectiva de células tumorales sin lesionar tejido normal, e inducir la respuesta inmune sistémica antitumoral (1,2).

La capacidad de ciertos virus para matar células tumorales se conoce desde casi un siglo pero ha sido en las últimas dos décadas que por medio de ensayos clínicos se ha demostrado el beneficio de esta terapia en pacientes con cáncer. Un ensayo clínico aleatorizado de fase III demostró una buena respuesta en pacientes con melanoma avanzado quienes fueron tratados con herpes simplex virus modificado (HSV-1) que codifica al factor estimulante de colonias – granulocito macrófago (GM-CSF). Este virus, denominado talimogene laherparepvec (T-VEC, Amgen) es el primer virus oncolítico aprobado para inmunoterapia en humanos por la U.S. Food and Drug Administration (FDA), el cual fue aprobado el 27 de Octubre de 2015 (3).

H101 (Shanghai Sunway Biotech) es un adenovirus oncolítico modificado genéticamente el cual en combinación con quimioterapia fue aprobado para el tratamiento de carcinoma nasofaríngeo en China en Noviembre de 2005.

Varios virus se han propuesto como vectores para terapia oncolítica, y se han realizados considerables esfuerzos para optimizar estos vectores al atenuar su patogenicidad y aumentar su inmunogenicidad. Entre los cuales se encuentran adenovirus,

coxsackievirus, poliovirus, Newcastle disease virus, measles virus, reovirus, herpes virus, entre otros.

La mayoría de virus oncolíticos matan directamente las células tumorales del hospedero, dicha actividad depende de la replicación viral, la eficiencia por el receptor celular objetivo, la respuesta antiviral de la célula y del huésped. El potencial lítico también depende del tipo de virus, dosis, tropismo viral ya sea natural o inducido y la susceptibilidad de la célula tumoral a los diferentes tipos de muerte celular: necrosis, apoptosis, autofagia y piroptosis.

Además de la inducción directa de la muerte de células tumorales, los virus oncolíticos también pueden inducir la respuesta inmune innata y adaptativa del huésped contra las células tumorales. Posterior a la muerte de células tumorales, estas pueden liberar “antígenos asociados a tumor” los cuales pueden generar una respuesta inmune adaptativa la cual promueve una regresión tumoral en sitios distantes donde no hubo exposición al virus.

Aunque varios ensayos realizan la administración intratumoral del virus en el caso de pacientes con metástasis se requiere una administración sistémica, sin embargo la neutralización por factores séricos y órganos como el bazo e hígado son barreras que pueden impedir alcanzar el umbral virémico, el cual es necesario para la infección de focos tumorales y consecuente efectividad en el tratamiento oncolítico. Por lo cual recientes estudios están enfocados en superar las barreras anteriormente mencionadas y promover la permeabilidad del endotelio vascular para facilitar el desplazamiento de los virus a los focos tumorales.

Entre las estrategias para disminuir el secuestro y depuración de los virus por el sistema retículo-endotelial dado por el bazo e hígado, se encuentra la modificación química de las proteínas virales por conjugación con polímeros biocompatibles como el polietilenglicol (PEG) y N-[2-hidroxipropil]met-acrilamida (HPMA), los cuales son usados clínicamente para prolongar los tiempos de circulación de proteínas y liposomas y para reducir los rangos de toxicidad.

Para superar las barreras posterior a la administración intravenosa: factores séricos, complemento, anticuerpos neutralizantes, eliminación por las células de Kupffer, entre otros; se están utilizando transportadores o “carriers” celulares, entre ellos las células

stem mesenquimales, las han usado recientemente para administrar eficazmente virus oncolíticos de sarampión (measles) a depósitos intraperitoneales de cáncer de ovario en presencia de anticuerpos antivirales neutralizantes (4).

La presente revisión sistemática busca determinar los métodos y técnicas utilizadas para la administración de virus oncolíticos in vivo y su efectividad en diversos tipos de cáncer.

# 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1 VIRUS ONCOLÍTICOS

Los virus oncolíticos tienen la capacidad de infectar, replicarse y matar células tumorales, con la ventaja de no realizarlo en células normales del organismo. Estas características de los virus oncolíticos dependen de los receptores, que permitirán la interacción con la célula tumoral, su unión a la membrana celular y entrada al citoplasma. También de la facilidad o no que presente el virus para replicarse al utilizar la maquinaria de la célula huésped; a menor respuesta de la célula a la entrada del virus, mayor es la probabilidad que pueda replicarse y formar así nuevas partículas virales(4,5,6).

La capacidad lítica de los virus en células tumorales también depende de la dosis o número de partículas virales que infectan la célula, del tipo de virus oncolítico, del tropismo propio del virus y de la susceptibilidad de la célula tumoral a determinado tipo de muerte celular, ya sea programada o no programada (6-8).

La replicación viral al interior de la célula tumoral genera lisis de esta, lo que causa la liberación de las partículas virales contenidas en el citoplasma y permite que se infecten células tumorales vecinas repitiendo así el ciclo inicial. La infección viral puede inducir una respuesta inflamatoria causando el reclutamiento de células dendríticas, macrófagos, neutrófilos y se puede inducir una respuesta inmune innata al activar células natural killer, y/o una respuesta inmune adaptativa dada por la activación y reclutamiento de linfocitos B y linfocitos T (4-11).

Al inducir los virus la muerte celular de la célula tumoral, aumenta la actividad de las células dendríticas y la activación de las células natural killer promoviendo la citotoxicidad del tumor. La respuesta inmune celular genera una respuesta oncolítica inicial por parte del sistema inmune, sin embargo tiempo después de la infección viral; macrófagos, natural killer y otras células de la respuesta innata eliminan las partículas virales. Por otra parte la respuesta inmune humoral hacia el tumor no suele dar una memoria inmunológica a largo plazo, por lo cual no suele presentarse inmunidad contra las células tumorales (11-13).

Para la selección de virus oncolíticos en la terapia antitumoral se debe cumplir con los criterios de seguridad y eficacia. Seguridad: Se debe tener en cuenta la especificidad del

virus por el tumor, cambios que se puedan dar en la patogenicidad, inmunidad previa al virus, presentación de efectos adversos. Se debe buscar que el virus genere la menor cantidad de riesgo posible. Eficacia: Para esto se necesitan metodologías que permitan una adecuada infiltración del virus en el tumor, evasión al sistema inmune por parte del virus y una elevada actividad lítica tumoral (6,11,13,17).

Las barreras a superar por parte de los virus oncolíticos antes de llegar a infiltrar las células tumorales son varias. Entre ellas y la primera al encontrarse el virus en el torrente sanguíneo es la presencia de anticuerpos neutralizantes y factores del complemento, que se unen a la superficie viral y reclutan células del sistema inmune para su posterior eliminación. Las células dendríticas poseen receptores de reconocimiento de patrón los cuales interactúan con las partículas virales, esto activa a las células dendríticas las cuales migran a los nódulos linfáticos y desencadenan la activación de las células natural killer (NK). Las células NK impiden la propagación viral al lisar las células infectadas; por otra parte la producción de citoquinas que atraen y activan a linfocitos T ayudadores y linfocitos T citotóxicos. Otra barrera es la eliminación del virus al transitar por órganos del sistema retículo-endotelial; entre ellos el hígado y el bazo (13-17).

Finalmente antes de llegar el virus oncolítico a la célula tumoral, se encuentra con la barrera del microambiente del tumor; el cual está compuesto por células estromales, infiltración de leucocitos, matrix extracelular la cual suele presentar una densidad aumentada; convirtiéndose en una barrera mecánica para el virus antes de interactuar con la célula tumoral.

Por otra parte, las células tumorales, así como las macrófagos asociados a tumor y fibroblastos asociados al tumor, producen sustancias que suprimen la respuesta inmune, lo que facilita la supervivencia, proliferación tumoral y estromal; lo que conlleva una mayor producción de matrix extracelular; además los tumores suelen estar mal vascularizados, por lo que el tránsito del virus por los vasos sanguíneos del tumor puede resultar limitado (13-17).

Varios de los virus oncolíticos utilizados en clínica tienen tropismo natural por proteínas de la superficie que son expresadas aberrantemente en la célula tumoral. Sin embargo los virus oncolíticos pueden ser modificados genéticamente para que tengan como blanco receptores o proteínas expresados en la superficie de la membrana de células tumorales. De igual forma modificaciones genéticas que promuevan la proliferación viral, active

mecanismos de muerte celular o afecte puntos de chequeo del ciclo celular, están siendo utilizados para el mejoramiento de la eficacia de virus oncolíticos en clínica (17,19).

Para el tratamiento con virus oncolíticos se han utilizado diferentes clases de virus; a continuación se hablará de los virus más utilizados en terapia oncolítica.

### 1.1.1. ADENOVIRUS

El adenovirus es un virus de DNA de doble cadena no envuelto, presenta un genoma linear encapsulado por una capsida icosehédrica. Tiene un diámetro entre 70 a 90 nm. El virus fue aislado en un cultivo de células de adenoides en la década de 1950. Puede infectar a seres humanos y animales, la transmisión es por contacto directo o por aerosol(4,7,8).

**Figura 1. Estructura del adenovirus**

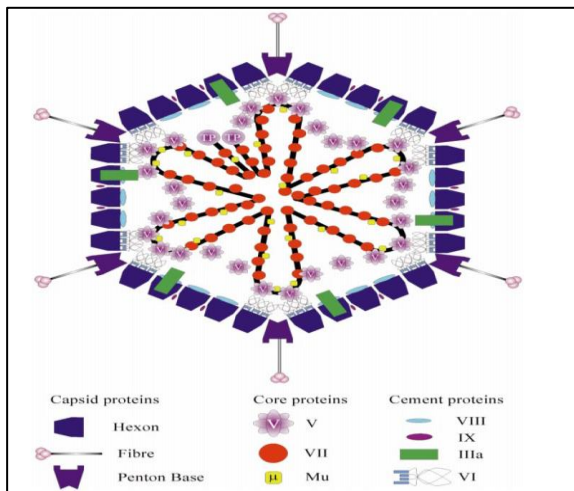


Figura tomada de Russell, W. Update on adenovirus and its vectors. Journal of General Virology (2000), 81, 2573–2604

Las infecciones por adenovirus suelen ser asintomáticas en adultos que son inmunocompetentes. En pacientes inmunocomprometidos o en recién nacidos el adenovirus puede causar dificultad respiratoria leve, trastornos gastrointestinales e infección ocular.

El adenovirus ingresa a la célula huésped al interactuar con el receptor adenovirus-



coxsackie (CAR.), al entrar a la célula se dirige al núcleo donde expresa los genes E1A y E1B; al codificarse a proteínas, estas interactúan con los supresores de tumor de la célula p53 y pRb (proteína asociada a retinoblastoma) lo cual promueve la entrada a ciclo celular. La replicación viral se da en dos fases: una temprana y otra tardía. Los genes que participan en la fase temprana son E1A, E1B, E2A, E3 y E4. En la fase tardía L1, L2, L3, L4 y L5. (4,7).

Hay 57 serotipos de adenovirus, los cuales están clasificados de la categoría A a la categoría G, esto según sus propiedades de aglutinación y potencial oncogénico. El subgrupo B es oncogénico débil, el subgrupo C incluyen los adenovirus tipo 2 y tipo 5. Los subgrupos D, E y F son no-oncogénicos. Se ha visto que los adenovirus humanos pueden transformar las células de ratón, pero no son oncogénicos en células humanas. Los serotipos 2 y 5 han sido evaluados en ensayos in vitro e in vivo como virus con actividad oncolítica. Ensayos clínicos han mostrado que tratamiento con adenovirus oncolíticos presenta pocos eventos adversos, lo cual es favorable para la seguridad en el tratamiento con este virus(4,8,25).

En la década de los 50s ensayos clínicos iniciales investigaron el potencial terapéutico de adenovirus oncolíticos en pacientes con cáncer cervical, se observó que solo una pequeña fracción de los virus se asoció con necrosis del tumor. Otros estudios evaluaron diversas rutas para la administración del virus, como la inyección intratumoral, infusión arterial o inyección intravenosa. No se reportaron eventos significativos de toxicidad con la administración de las diferentes rutas. La respuesta clínica de los pacientes fue limitada y al final todos los pacientes terminaron falleciendo por el cáncer (4,7,8,12).

Adenovirus han sido modificados para redirigirlos a interactuar con receptores que se encuentran sobreexpresados en células tumorales; se está evaluando clínicamente en cáncer de ovario, con un adenovirus modificado Ad5/3-  $\Delta$ 24. Ya que el cáncer de ovario tiene un patrón de expresión variable de CAR, la cápside viral fue modificada para incorporar un motivo de RGD (Arg-Gly-Asp) una porción de la capa externa de la cápside. Dicha modificación permite la entrada a la célula por medio de la unión del adenovirus a otros receptores como a integrinas  $\alpha\beta 3$  y  $\alpha\beta 5$  las cuales se encuentran sobreexpresadas en las células de cáncer de ovario (13,23). DNX-2401, un adenovirus también modificado con el motivo RGD se encuentra en ensayo clínico fase I in pacientes con glioma (24).

El virus ONYX-015 se evaluó en algunos ensayos clínicos, sin embargo en 2003 fue detenido su estudio. H101 es un adenovirus con delección en E1B que fue aprobado para el tratamiento de cáncer nasofaríngeo en China (18,19).

Este virus se evaluó en un estudio clínico aleatorizado de fase III en 160 pacientes con avanzado carcinoma escamocelular de cabeza y cuello. Se administró quimioterapia con cisplatino y 5-fluoruracilo para pacientes que iniciaban régimen de quimioterapia, y adriamicina + 5 fluoruracilo en pacientes que habían recibido quimioterapia previamente con cisplatino. Esto con o sin la adición de H101 aplicado a  $5 \times 10^{11}$  a  $1.5 \times 10^{12}$  partículas virales por día en inyección intratumoral, por 5 días cada 3 semanas. 123 pacientes completaron el tratamiento, pacientes que fueron tratados con cisplatino y 5-fluoruracilo + el adenovirus H101 tuvieron una tasa de respuesta del 78.8% comparada con 39.6% del grupo de pacientes tratado con cisplatino y 5-fluoruracilo sin H101. El grupo de pacientes que recibieron tratamiento con adriamicina y 5-fluoruracilo + H101 y el grupo tratado con adriamicina y 5-fluoruracilo sin H101 tuvieron ambos una tasa de respuesta del 50%. Sin embargo se observó una diferencia significativa en la tasa de respuesta al comparar pacientes tratados con quimioterapia solamente con los pacientes tratados con quimioterapia + H101. Los eventos adversos que se presentaron fueron reacción inflamatoria en el sitio de punción, fiebre, y sintomatología similar a la gripe. La agencia regulatoria China aprobó al adenovirus H101 para el tratamiento de carcinoma nasofaríngeo en combinación con un régimen quimioterapéutico (4,25).

### **1.1.2. COXSACKIEVIRUS**

Coxsackievirus es un enterovirus no envuelto de RNA lineal con sentido positivo, de cadena sencilla, miembro de la familia Picornaviridae. Este virus se replica en el citosol sin una fase de DNA, esto hace que la mutagénesis de tipo insercional durante el proceso infeccioso no se presente. Se presentan dos subgrupos: el A y B, cuya diferencia radica en la patogenicidad en modelos de ratones. Hay 23 serotipos del grupo A y 6 serotipos del grupo B. las infecciones por Coxsackie suelen ser asintomática, aunque en niños menores pueden ser más susceptibles a la infección con el tipo A. La infección ocurre por interacción con la piel, los síntomas presentados son similares a los de un resfriado (4, 15,16).

Coxsackievirus utiliza la molécula de adhesión intercelular ICAM-1 y DAF para su entrada a la célula huésped. Actualmente cepas de los grupos de coxsackie están siendo evaluadas para tratamiento en diferentes tipos de cáncer.

## Figura 2. Estructura del Coxsackievirus

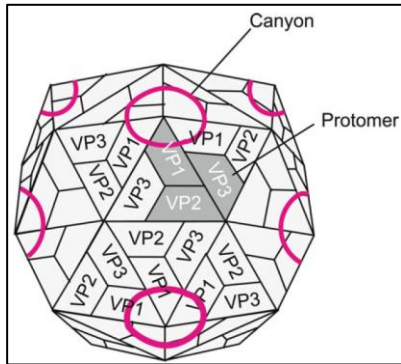


Figura tomada de Modrow, S. Molecular Virology. 3rd edition (2013), 192.

Estudios han mostrado que coxsackievirus no solo induce lisis directa a las células tumorales, sino que también puede promover la respuesta inmune al inducir la liberación de moléculas asociadas a daño (DAMPs), la infección por este virus también induce la infiltración de células NK y linfocitos T, lo cual puede incrementar la liberación de IFNs (4,15).

Una ventaja de este virus es que no requiere muchas modificaciones para aumentar su actividad oncolítica o su especificidad. También se ha visto que genera una fuerte respuesta inmune en el proceso de infección. Sin embargo el hecho que algunas personas hayan estado expuestas al virus en algún momento de su vida, puede generar inmunidad a la infección por coxsackie. Al parecer los anticuerpos generados por parte del huésped parece que no presentan reactividad cruzada entre serotipos, por lo que sería necesario determinar el serotipo del virus que presenta respuesta inmune en el paciente para poder escoger otro serotipo(15,16).

Coxsackievirus A21 (CVA-21) tiene un tropismo natural por algunos tipos de cáncer como melanoma y mieloma múltiple, pues sobreexpresan ICAM-1 y DAF. Ensayos clínicos de Fase I y II están aplicando CVA-21 intratumoralmente en pacientes con melanoma, los resultados preliminarles parecen ser satisfactorios. Los ensayos preclínicos se han realizado con coxsackie nativo, por lo que no se han efectuado modificaciones genéticas para aumentar su especificidad o potencia oncolítica (4,16).

### 1.1.3. HERPES VIRUS

El Herpes simplex virus (HSV-1) es miembro de la familia alfa herpesvirus, de la cual la varicela también pertenece. Es un virus de DNA de doble cadena con un genoma que mide aproximadamente 152kb. Aunque la replicación viral ocurre en el núcleo de la célula huésped, no se presentan fenómenos de mutagénesis insercional (4,7,12).

El herpes simplex causa la mayor parte de lesiones en piel, también puede infectar los nervios periféricos y entrar en estado latente debido al proceso de flujo axoplásmico retrogrado; permitiéndole al virus permanecer por muchos años y reactivarse posteriormente (ya sea por estímulos físicos como variación abrupta de temperatura, o por interacción con componentes del sistema inmune. Aunque aún no se conoce con certeza cuales es el mecanismo específico que media en la reactivación del virus); como ocurre en la neuropatía herpética; la parálisis del nervio facial también se ha asociado a casos de infección por herpes (12,14).

**Figura 3. Estructura del Herpes virus**

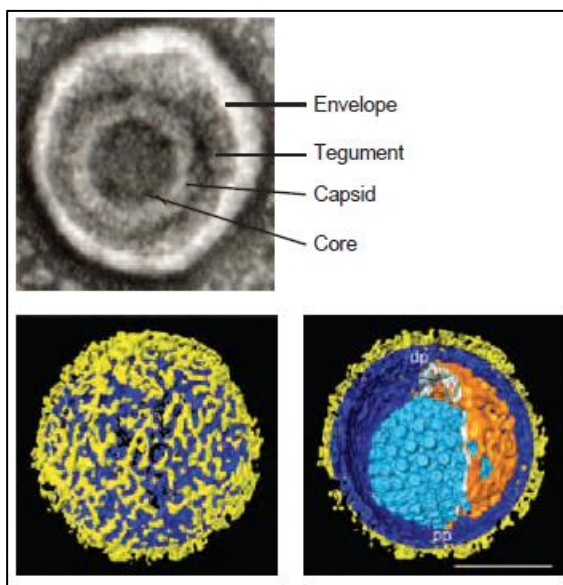


Figura tomada de Knipe, D. Fields Virology. 6th edition (2013), 1825.

El HSV-1 puede infectar varios tipos de células, entre estas se encuentran las células epiteliales, por medio de las glicoproteínas de membrana; en el caso de neuronas lo hace por medio de las proteínas nectinas presentes en la membrana celular(4,8).

El virus consta de 3 componentes estructurales principales: un núcleo central donde se encuentra el DNA viral, una envoltura compuesta de glicoproteínas y la cápside. Este virus causa infecciones líticas y latentes, donde la replicación viral sucede dentro de las 15 horas de exposición al virus. Después de la infección la célula es lisada, permitiendo la liberación de partículas virales(7,8).

T-VEC es un HSV-1 que contiene deleciones en el gen: inhibidor de presentación de antígeno (ICP47) y del gen de neurovirulencia ICP34.5. Las modificaciones en estos genes aumentan la selectividad del virus por células tumorales y previenen la infección a neuronas. La deleción de ICP47 también induce la activación del promotor US11, su proteína codificada bloquea la fosforilación de PKR, lo que previene la apoptosis de la célula en la infección (4,8,12).

Por otra parte, modificación del HSV-1 al reemplazar el ICP34.5 por el gen codificante al factor estimulante de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF), se ha observado que aumenta la inducción de actividad antitumoral. T-VEC ha mostrado efectos líticos potentes en líneas celulares de cáncer de páncreas y en líneas de melanoma. También se han realizado ensayos clínicos en pacientes con carcinoma de cabeza y cuello, con cáncer de páncreas y pacientes con melanoma (4,8,16).

En un ensayo clínico de fase II, pacientes con melanoma en estadios IIIC y IV fueron tratados con una dosis inicial de  $10^6$  pfu/mL T-VEC por inyección intratumoral. Tres semanas después  $10^8$  pfu/mL administrado cada dos semanas hasta presentar toxicidad, progresión de la enfermedad o la mayor respuesta clínica. La tasa de respuesta fue del 26% entre los 50 pacientes que participaron en el estudio (4,12,14, 22).

Otros estudios también están usando T-VEC en combinación con agentes inmunoterapéuticos como anticuerpos monoclonales (14,18).

Un ensayo clínico de fase Ib de administración de T-VEC y ipilimumab, anticuerpo monoclonal que bloquea CTLA4, que es un inhibidor de la actividad del linfocito T, han reportado tasas de respuesta completa de 22%, siendo estos resultados parciales(7,12,16).

### 1.1.4. MEASLES VIRUS

El virus Measles es miembro de la familia paramixovirus, con un genoma de 15kb, mide 150nm de diámetro. Contiene seis genes que codifican para ocho proteínas. Para entrar a la célula utiliza el receptor de la molécula de activación linfocítica (SLAM), que se expresa mayormente en linfocitos. Se replica en el citoplasma, produciendo proteínas de la cápside y RNAs virales. Este virus para propagarse induce la fusión entre células, lo cual genera agregados multicelulares, lo cual al final lleva a la muerte celular (4,13).

**Figura 4. Estructura del Measles virus**

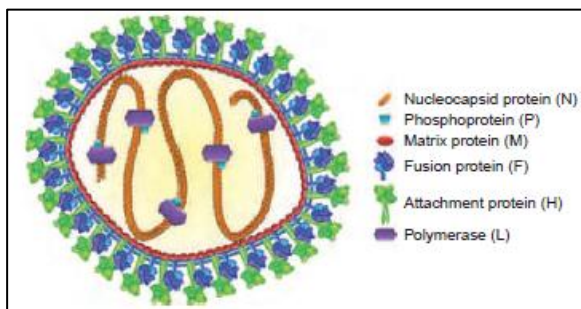


Figura tomada de Knipe, D. Fields Virology. 6th edition (2013), 1044.

Measles virus es muy contagioso por vía respiratoria, la vacunación a larga escala ha atenuado la infección del virus en la población. La infectividad del virus salvaje ha limitado su uso como agente viral oncolítico. Sin embargo el uso de sepas atenuadas son más seguras para su estudio (13,14).

Estudios de casos realizados en la década de los 70s documentaron eventos de regresión espontanea del tumor asociado aparentemente con la infección de measles, particularmente en cáncer de origen hematológico.

La cepa atenuada del Measles virus: Edmonston se ha evaluado en algunos ensayos clínicos para varios tumores, como glioblastoma multiforme, cáncer de ovario y mieloma múltiple (4,13,26,27). En el ensayo clínico de fase I de pacientes con cáncer de ovario avanzado se utilizó el MV modificado MV-CEA, dosis de  $10^3$  a  $10^9$  TCID<sub>50</sub> se administraron intraperitonealmente en pacientes inmune-measles con cáncer de ovario resistente al cisplatino y enfermedad delimitada a la cavidad peritoneal (13,14,27).

Los pacientes seleccionados no podían tener niveles elevados de CEA, y si los presentaban durante el ensayo, debía ser a causa de la replicación del virus. En total se

trataron 21 pacientes a siete niveles de dosis de  $10^3$  a  $10^9$  TCID<sub>50</sub>, no se observó toxicidad por dosis. Entre los efectos adversos presentados por los pacientes está el dolor abdominal, náusea, anorexia, fatiga y fiebre.

La elevación de CEA se detectó en un paciente el cual recibió una dosis del grupo de  $10^8$  TCID<sub>50</sub> y en el suero de 3 pacientes (grupo con dosis de  $10^9$  TCID<sub>50</sub>). La mejor respuesta objetivo fue de enfermedad estable, lograda por 14 pacientes con una duración media de 88 días y un rango de 55 a 277 días (13,14).

La terapia oncolítica con Measles puede tener dificultades ya que como sucede con otros virus infecciosos, muchos pacientes pueden haber estado expuestos al virus o a la vacuna contra este, por lo que es necesaria la modificación genética del virus para evitar la respuesta inmune del paciente (4,13,14,19,21).

### 1.1.5. NEWCASTLE DISEASE VIRUS

El virus Newcastle es un paramixovirus aviar de RNA de cadena sencilla envuelto, con un tamaño que varía de 200 a 300nm de diámetro. Tiene 6 genes principales que codifican para: nucleocapside(N), proteína de matrix (M), fosfoproteína (P), proteína de fusión (F), proteína hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y proteína polimerasa larga (L). La proteína N forma la nucleocapside que contiene el RNA genómico para el cual las proteínas P y L permanecen unidas. La proteína de matrix es no glicosilada y se encuentra debajo de la envoltura, se sabe que es encargada del ensamblaje del virus (4,7,28).

**Figura 5. Estructura del NDV**

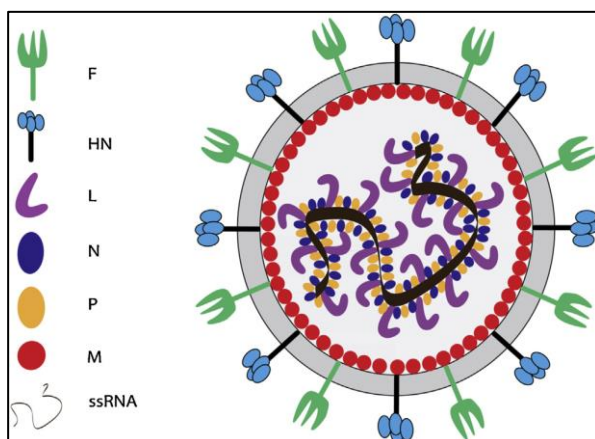


Figura tomada de K. Ganar et al. Newcastle disease virus: Current status and our understanding. *Virus Research* 184 (2014) 71–81

NDV infecta a las células blanco por fusión con la membrana celular o por endocitosis directa el virus. Se replica en el citoplasma, por lo que las células que se encuentran infectadas no presentan mutagénesis insercional. El virus Newcastle es sensible a interferones de tipo I, y por otra parte las proteínas del virus generan aumento del interferón tipo I. Esta característica le confiere especificidad a las células tumorales, pues estas presentan niveles bajos o nulos de interferón. La sobreexpresión de BCL X<sub>L</sub> en células tumorales le confiere sensibilidad a la apoptosis mediada por NDV (12,15,16,28).

NDV activa la apoptosis en células tumorales e induce la activación del sistema inmune por el incremento en la producción de citoquinas como el interferón tipo I, CCL5, factor estimulante de colonias granulocito macrófago (GM-CSF) y promueve la presentación antigénica(4,15,28).

La proteína hemaglutinina-neuroaminidasa (HN) puede actuar como un antígeno que aumenta la respuesta citolítica de linfocitos T sobre las células cancerosas que se encuentran infectadas. El virus Newcastle se replica 10<sup>4</sup> veces más rápido en células tumorales que en células normales. La apoptosis inducida por el virus Newcastle a las células tumorales, convierte el microambiente tumoral de un estado inmunosuprimido a uno proinflamatorio lo cual favorece la respuesta inmune antitumoral (12,28).

Varios estudios indican que NDV tiene una actividad antitumoral contra una variedad de tumores, sin embargo los ensayos clínicos son limitados. También se ha observado que a pesar que no hay una respuesta inmune de memoria contra el virus Newcastle en humanos, la respuesta inducida por el virus al infectar un huésped si es potente, lo cual limita el rango máximo de dosis para aplicar en humanos(15,16,28).

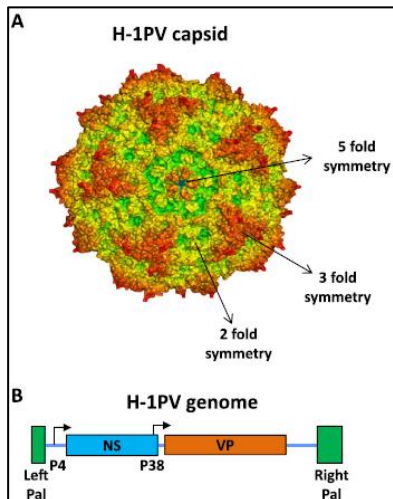
### **1.1.6. PARVOVIRUS**

El parvovirus pertenece a la familia Parvoviridae, que tiene una capsida icosaédrica, un DNA de cadena sencilla de aprox. 5000 nucleótidos. Tiene 25 nm de diámetro, Tiene secuencias palindrómicas terminales (Pal) que sirven como origen de replicación self-priming. La transcripción es regulada por los promotores P4 y P38. Hay dos unidades de



transcripción codificando para proteínas no estructural (NS) y estructural (VP) (ver figura 6). La proteína NS: NS1 tiene un rol principal en el ciclo de vida del virus ya que es esencial para la replicación del DNA viral, la expresión génica y los efectos citotóxicos inducidos por el virus (29).

**Figura 6. Estructura del Parvovirus**



A) Un modelo de capsido icosaédrico, se muestran los 2,3 y 5 ejes de simetría. B) DNA lineal de cadena sencilla 5kb. Tiene secuencias palindrómicas terminales (Pal) que sirven como origen de replicación self-priming. Transcripción es regulada por los promotores P4 y P38. Hay dos unidades de transcripción codificando para proteínas no estructural (NS) y Estructural (VP) respectivamente. Imagen tomada de Marchini et al. Virology Journal (2015) 12:6.

El parvovirus oncolítico H-1 (H-1PV) se replica autónomamente en células blanco, en cercana relación con los factores de diferenciación y proliferación celular. En modelos in vitro se ha observado que el H-1PV tiene especificidad por las células tumorales para replicarse, y posteriormente matarlas; no presenta actividad lítica ni replicativa en su contraparte celular normal (29,30).

Se realizó un ensayo clínico con H-1PV en pacientes con tumores malignos de cerebro; se aplicaron dosis escaladas entre un rango de  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^7$ , y  $1 \times 10^9$  pfu. El tratamiento inicial fue por inyección intratumoral de la mitad de la dosis total por paciente seguido por 9 días de observación, donde el virus podría interactuar con el tumor. La resección del tumor fue realizada al día 10 y la segunda mitad de la dosis fue administrada por varias inyecciones adyacentes al tumor. Se hizo un nuevo intervalo de 38 días. Se observó que todas las inyecciones de virus H-1PV fueron bien toleradas, no se presentaron eventos de toxicidad por dosis.

Después de mostrar seguridad en el tratamiento por vía intratumoral, se realizaron

ensayos por vía intravenosa; Los pacientes fueron inyectados con una dosis total de  $5 \times 10^7$  o  $1 \times 10^9$  pfu de H-1PV. Los pacientes recibieron diariamente infusiones de virus del 10% del total de la dosis administrada del día 1 a 5, seguido por un periodo de descanso de 4 días. Al día 10, cirugía e inyección intraparenquimal de la segunda mitad de la dosis planeada de H-1PV. Después de la inyección intravenosa no se observaron efectos adversos, no fiebre ni signos de infección por virus. Basado en estos ensayos se puede considerar al H-1PV bien tolerado y seguro a una dosis acumulativa de  $1 \times 10^9$  pfu (30,31).

### 1.1.7. POLIOVIRUS

Es un virus no envuelto, pertenece a la familia picornaviridae, RNA de cadena sencilla y tiene 30 nm de diámetro. El virus de polio entra a la célula al unirse a CD155, luego de la internalización viral se replica en el citoplasma (4,32).

**Figura 7. Estructura del Poliovirus**

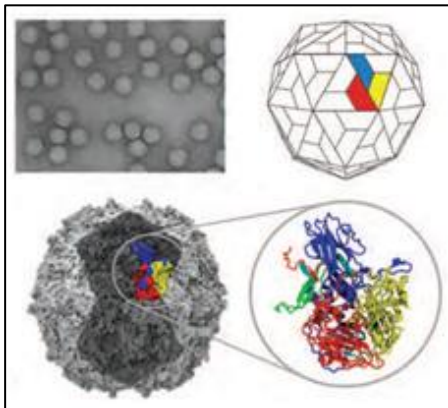


Figura tomada de Knipe, D. Fields Virology. 6th edition (2013), 455.

El poliovirus es muy patogénico en los seres humanos, pues de los individuos infectados por el virus desarrollan poliomeilitis parálitica en aproximadamente el 1% de los casos, esto es debido a la destrucción de las motoneuronas del asta anterior posterior a la infección.

Por esto el poliovirus necesita ser atenuado para utilizarse como virus oncolítico. Un estudio mostró que una cepa atenuada: Sabin, presenta tropismo por células de glioma,

lo cual probablemente está relacionado con la sobreexpresión de CD155 en este tipo de tumor (4,15).

El poliovirus reconoce un único receptor de la célula huésped el cual es necesario y suficiente para generar susceptibilidad por el virus. El receptor del poliovirus Nect5 o molécula 5 similar a la nectina, es una molécula de adhesión celular involucrada en procesos de movimiento celular, adhesión y de polaridad celular.

Para reducir la neurovirulencia del poliovirus es atenuado al reemplazar el sitio de entrada interno del ribosoma (IRES) con un IRES del virus rhino tipo 2 humano (HRV2), denominado a este constructo RIPO. Cuando se realiza este reemplazo la selectividad del poliovirus –RIPO (PVS-RIPO) aumenta por las células de Glioblastoma multiforme.

HRV2 IRES se une al heterodímero DRBP76–NF45 (comprising cellular double-stranded RNA-binding protein 76 y el factor nuclear de células T activado); esta interacción bloquea la replicación viral en neuronas normales, pero no en células de glioma (4,15,32).

Los buenos resultados obtenidos de ensayos preclínicos de PVS-RIPO en modelos de Glioblastoma multiforme, han permitido empezar ensayos clínicos de fase I en pacientes con Glioblastoma multiforme (4,32).

### **1.1.8. REOVIRUS**

Miembro de la familia Reoviridae, es un virus con RNA de doble cadena no envuelto, su genoma está compuesto por 10 segmentos de dsRNA, con una cápsula icosaédrica de superficie exterior y un núcleo interno. Hay tres serotipos de reovirus: serotipo 1 Lang (T1L), serotipo 2 Jones (T2J) y serotipo 3 Dearing (T3D) (4,33,34).

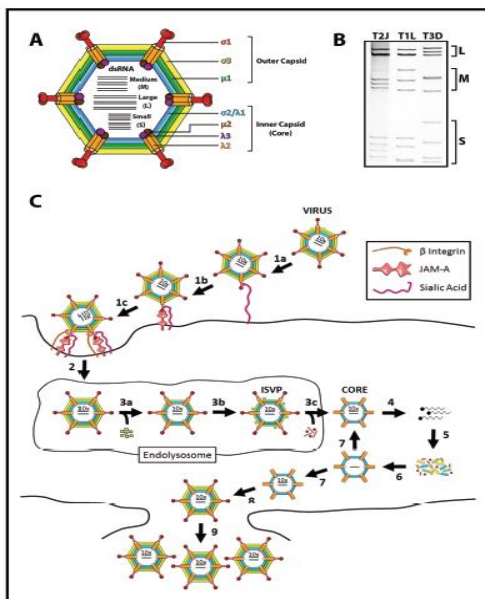
La replicación viral ocurre en el citoplasma de las células infectadas. En células normales el reovirus inicia su proceso de transcripción al producir RNAs virales que ayudan en la replicación, pero también activa la vía PKR; sin embargo en células Ras transformadas la vía PKR está bloqueada. Por esto el reovirus tiene como células blanco a los tumores Ras mutantes (33,34).

Por este tropismo natural del Reovirus se ha estudiado en diversos tipos de cáncer como gliomas, melanoma, cáncer colorrectal y cáncer de ovario. Entre el 70- 100% de

pacientes participantes en algunos ensayos, resultaron seropositivos para anticuerpos neutralizantes contra el reovirus (4,7,8,13).

El primer ensayo clínico fase I que utilizó al reovirus como monoterapia oncolítica, consistió en monoterapia intralesional de 18 pacientes con tumores sólidos avanzados, incluyendo cáncer de mama, sarcomas de tejidos blandos, cáncer de cabeza y cuello y melanoma. EL estudio buscaba determinar la seguridad y la tolerancia de la administración percutánea intralesional de reovirus en pacientes que habían tenido intervenciones terapéuticas previas. Los pacientes fueron monitoreados por 6 semanas, la toxicidad fue medida de acuerdo a los criterios de toxicidad del grupo de ensayos clínicos del Instituto Nacional de Cáncer y la respuesta tumoral fue medida por los criterios (RECIST). (33,34)

**Figura 8. Estructura y replicación del Reovirus**



(A) Reovirus: proteínas de la capsida externa e interna; (B) Perfil Genómico dsRNA serotipos de reovirus 1 Lang, 2 Jones, and 3 Dearing; (C) Ciclo de vida del reovirus. LA unión es mediada por (1a) unión al ácido siálico, (1b) Asociación JAM-A y (1c) Unión a  $\beta$  integrina; (2) Reovirus es internalizado por endocitosis dentro de endosomas tardíos/lisosomas; (3) proceso de desnudamiento/descubrimiento a través de (3a) remoción proteolítica de  $\sigma 3$ , (3b) clivaje de  $\mu 1$  a  $\delta$ , y (3c) pérdida concomitante de  $\sigma 1$  con penetración de la membrana y transición a nucleos; (4) +sense RNAs Viral es transcrito y liberado por las partículas del núcleo citoplasmático; (5) Proteínas del Reovirus son expresadas y (6) Ensamblaje de las partículas con +sense RNAs dentro del núcleo de la progenie; (7) dsRNA genómico es sintetizado dentro del núcleo de la progenie, los cuales sirven para amplificar la síntesis macromolecular del reovirus; (8) Reovirus es ensamblado completamente por adición de proteínas de la capsida externa y liberado de la célula por lisis y/o apoptosis. Tomado de Mohamed, A. Viruses 2015, 7, 6251–6278.

Después de seis semanas un paciente mostró respuesta completa, dos pacientes

mostraron respuesta parcial, cuatro pacientes enfermedad estable, y diez mostraron enfermedad progresiva. Estos resultados mostraron por primera vez que el reovirus administrado intralesionalmente hasta  $1 \times 10^{10}$  pfu como monoterapia, es bien tolerado y seguro, sin toxicidad por alcanzar el límite de dosis (33, 34).

Basados en los resultados obtenidos en este ensayo, se realizó un estudio translacional para determinar la actividad oncolítica del reovirus en modelos preclínicos y en seis pacientes con cáncer de próstata. Los pacientes primero recibieron una única inyección de reovirus de  $1 \times 10^7$  pfu, y tres semanas después se les realizó prostatectomía. El ensayo de inmunohistoquímica en los tejidos tumorales de próstata resecados mostró la afinidad del reovirus para infectar tejido tumoral en lugar de tejido normal de próstata. También se demostró apoptosis e infiltración linfocitaria en las muestras tumorales (18, 34).

Dos ensayos clínicos posteriores observaron si el reovirus puede ser administrado sistémicamente de forma segura para tratar tumores y sus metástasis asociadas. En uno se observó al examen de las muestras histológicas obtenidas de biopsia post-tratamiento que había necrosis extensiva y marcadores de replicación viral (34).

El segundo estudio trató 33 pacientes, tres presentaron niveles reducidos de marcadores tumorales posterior a la administración de reovirus. Un examen con tomografía computarizada mostró necrosis del tumor en un paciente, presentando un 12% de reducción.

Los resultados de estos dos ensayos clínicos de fase I confirmaron los resultados de seguridad de aplicación del reovirus obtenidos en otros ensayos previos. Esto permitió llegar a la conclusión que inyecciones intravenosas mensuales de reovirus son bien toleradas y seguras en pacientes con tumores malignos avanzados.

El primer ensayo clínico fase II para monoterapia con reovirus intravenoso se realizó con pacientes que presentaban melanoma metastásico. En el estudio 21 pacientes fueron inyectados intravenosamente con reovirus a dosis de  $3 \times 10^{10}$  TCID<sub>50</sub>, una vez cada 60 minutos entre los días 1-5 cada 4 semanas, y fueron monitoreados por 8 semanas(34).

Ningún paciente mostró respuesta completa (CR) o respuesta parcial (PR), sin embargo un paciente presentó necrosis tumoral extensiva en dos lesiones metastásicas después de 2 ciclos de tratamiento. Se confirmó la evidencia de los resultados anteriores con

respecto a la seguridad y tolerancia a la administración de reovirus.

Sin embargo no se mostró la efectividad del reovirus usado como monoterapia en tumores agresivos, pero por los resultados de tolerancia y seguridad a la administración sistémica, puede ser utilizado en terapia combinada con otros medicamentos antitumorales.

Se realizó un ensayo clínico combinando gemcitabina con reovirus, para el tratamiento de 16 pacientes con tumores malignos avanzados incluyendo: Cáncer colorrectal, de mama, cáncer de ovario, NSCLC, fibrosarcoma, adenocarcinoma esofágico, colangiocarcinoma, carcinoma pobremente diferenciado e indiferenciado. La dosis de reovirus fue de  $1 \times 10^{10}$  TCID<sub>50</sub> en el día 1, y gemcitabina a 1000mg/m<sup>2</sup> en día 1 y 8 de un ciclo de 21 días. De los diez pacientes evaluados, un paciente presentó respuesta parcial (PR) y leve disminución del tumor después de cuatro ciclos de terapia (34).

Los estudios clínicos de terapia combinada de reovirus con otros agentes quimioterapéuticos han mostrado que el reovirus es seguro en su administración y que no aumenta la toxicidad del otro medicamento administrado o viceversa; dicho medicamento no aumenta la toxicidad del reovirus (4,7,8,13,14,33,34).

### **1.1.9. VACCINIA VIRUS**

Es un miembro de la familia de poxvirus, tiene un dsDNA de 190kb. Se replica en el citoplasma de la célula huésped, por lo que eventos de mutagénesis insercional son poco probables. El virus vaccinia presenta un tropismo alto por células tumorales. El virus entra a la célula por un proceso endocítico por medio de la membrana celular (4,8,14,35,36).

Las infecciones por vaccinia virus de personas inmunocomprometidas pueden causar enfermedades sistémicas; sin embargo en personas inmunocompetentes las infecciones son asintomáticas (4,8,14,).

Debido al tamaño de su genoma, vaccinia tiene la capacidad de aceptar largos transgenes; el virus se ha modificado para expresar antígenos tumorales como PCA, CEA y mucin 1; moléculas coestimuladoras de células T y citoquinas inflamatorias. También se ha observado que induce una fuerte respuesta inmune, tanto celular como humoral (14,15,16).

## Figura 9. Estructura del Vaccinia Virus

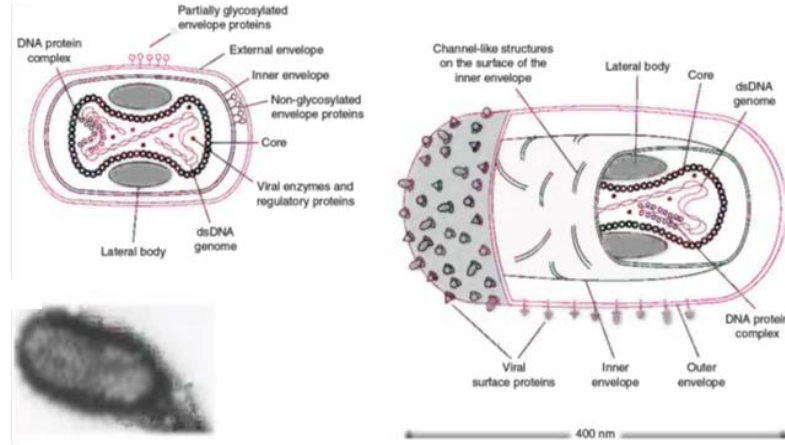


Figura tomada de Modrow, S. Molecular Virology. 3rd edition (2013), 834.

Un virus vaccinia codificante de B7.1 molécula co-estimuladora de célula T (rV-B7.1) fue evaluado en un ensayo clínico fase I en pacientes con melanoma avanzado; se observó que el virus es seguro, los pacientes desarrollaron respuesta de célula T específica para melanoma. Se encontró que 3 de 12 pacientes mostraron evidencia de regresión tumoral, de los cuales uno presentó respuesta completa (35).

Un virus vaccinia que codificaba al factor estimulante de colonias granulocito-macrofago GM-CSF (JX-594) fue evaluado en un estudio aleatorizado de hallazgo de dosis; 30 pacientes que presentaban carcinoma hepatocelular avanzado recibieron una baja dosis:  $10^8$  pfu, un total de 14 pacientes o altas dosis:  $10^9$  pfu un total de 16 pacientes: recibieron inyecciones intratumorales los días 1, 15 y 29 (35).

Se observó expresión de GM-CSF y replicación viral antes de la respuesta terapéutica. Se presentó un 15% de tasa de respuesta. La supervivencia media fue mayor en pacientes que recibieron dosis altas de virus: 14.1 meses, comparado a los pacientes que recibieron bajas dosis: 6.7 meses (35).

Los ensayos clínicos de vaccinia virus han reportado buena seguridad en la administración al igual que baja toxicidad dada por efectos adversos menores como fiebre y dolor local (16,35).

### 1.1.10. VESICULAR STOMATITIS VIRUS

El virus Stomatitis (VSV) pertenece a la familia Rhabdoviridae, RNA de cadena sencilla con sentido negativo, es un virus envuelto. Puede infectar un amplio espectro de tipos celulares. Este virus se replica en el citoplasma de las células infectadas, pero no hay integración del genoma viral en el genoma del huésped por lo cual no hay inserción mutacional. Su genoma de 11kb codifica 5 proteínas: Glicoproteína de superficie (G), nucleocapside (N), fosfoproteína (P), polimerasa larga (L) y matrix (M). (37)

**Figura 10. Estructura del VSV**

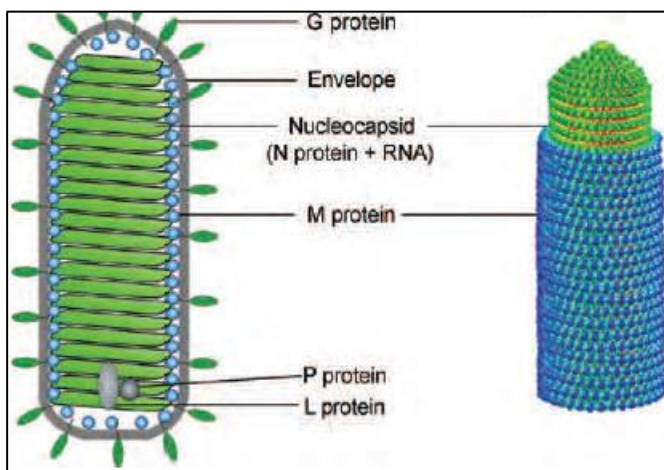


Figura tomada de Knipe, D. Fields Virology. 6th edition (2013), 891.

Un estudio *in vitro* evaluó el efecto oncolítico del VSV en células de cáncer de ovario, se observó que al tratar las células de ovario no tumorales, estas presentaban bajos títulos virales y su crecimiento fue regular por el periodo examinado de 3 semanas. Sin embargo al tratar las células de cáncer de ovario con VSV, la replicación viral fue elevada desde el primer día de aplicación y las células tumorales murieron al tercer días post-aplicación de VSV (15,37).

Su oncoespecificidad se debe al defecto en la producción de interferón tipo I en células tumorales, lo que le permite infectar diferentes tipos de tumores. Un estudio evaluó VSV modificado con IFNB: VSV-hIFNB en macacos Rhesus administrado por inyección intrahepática; no se presentaron síntomas neurológicos y se consideró seguro en su administración (15,37).

La siguiente tabla resume los principales virus oncolíticos que están siendo evaluados en



clínica.

**Tabla 1. Virus Oncolíticos en Ensayos Clínicos**

VIRUS	FABRICANTE	MODIFICACIÓN	NÚMERO DE ENSAYOS CLÍNICOS			TUMORES
			FASE I	FASE II	FASE III	
<b>Adenovirus</b>						
Onyx-015	Onyx Pharmaceuticals	Tipo 2/5 quimera, E1B delección	6	6	0	Cáncer de cabeza y cuello, de páncreas, de ovario, colorrectal, gliomas, metástasis
H101	Shanghai Sunwaybio	E1B delección, delección parcial E3	1	2	1	Carcinoma de células escamosas y cáncer de cabeza y cuello
DNX-2401	DNATRIX	Inserción Δ24-RGD	4	0	0	Glioblastoma, cáncer de ovario
VCN-01	VCN Biosciences	Inserción PH20 hialuronidasa	2	0	0	Cáncer de páncreas
Colo-Ad1	PsiOxus Therapeutics	Quimérico Ad11/3 grupo B	1	2	0	Cáncer de colon, NSCLC, cáncer renal, de vejiga y de ovario
ProstAtak	Advantagene	Inserción TK	4	1	1	Cáncer de páncreas, de pulmón, de mama, mesotelioma y cáncer de próstata
Oncos-102	Oncos Therapeutics	Inserción Δ24-RGD-GM-CSF	1	0	0	Cánceres sólidos
CG0070	Cold Genesys	GM-CSF y delección E3	1	1	1	Cáncer de vejiga
<b>Vaccinia virus</b>						
Pexa-vac (JX-594)	Jennerex Biotherapeutics	Inserción GM-CSF, disrupción TK	7	6	0	Melanoma, cáncer hepático, de mama, colorrectal y carcinoma hepatocelular
GL-ONC1	Genelux	Disrupción TK, de hemaglutinina y de F14.5L	4	1	0	Cáncer de pulmón, de cabeza y cuello y mesotelioma
<b>Herpesvirus</b>						
T-VEC	Amgen	Delección de ICP34.5 y de US11, inserción GM-CSF	2	3	2	Melanoma, cáncer de cabeza y cuello y de páncreas
G207	Medigene	Delección de ICP34.5, disrupción de UL39	3	0	0	Glioblastoma, cáncer de ovario
HF10	Takara Bio	Delección UL56, seleccionado para una copia parcial única de UL52	2	1	0	Cáncer de mama, melanoma y cáncer de páncreas
SEPREHVIR (HSV1716)	Virtu Biologics	Delección de ICP34.5	5	1	0	Carcinoma hepatocelular, glioblastoma, mesotelioma, neuroblastoma
OrienX010	OrienGene Biotechnology	Delección de ICP34.5, de ICP47 e inserción de GM-CSF	1	0	0	Glioblastoma
<b>Reovirus</b>						
Reolysin	Oncolytics Biotech	Ninguna	15	9	0	Glioma, sarcomas, cáncer colorrectal, NSCLC, cáncer de ovario, melanoma, cáncer pancreático, de cabeza y cuello, mieloma múltiple
<b>Seneca Valley virus</b>						
SVV-001	Neotropix	Ninguna	3	1	0	Tumores neuroendocrinos, neuroblastoma y cáncer de pulmón
<b>Coxsackievirus</b>						
Cavatak (CVA21)	Viralitics	Ninguna	3	1	0	Melanoma, cáncer de mama y de próstata

GM-CSF, granulocyte–macrophage colony-stimulating factor, NSCLC, non-small-cell lung cancer; RGD, Arg-Gly-Asp motif; TK, thymidine kinase; US11, unique short 11 glycoprotein. Tabla adaptada de Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. Howard L. Kaufman SEPTEMBER 2015 | VOLUME 14 | DRUG DISCOVERY

## 2. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son los métodos utilizados en la aplicación de virus oncolíticos para tratamiento del cáncer en humanos o animales?

De los métodos encontrados, ¿Cuáles son los más efectivos que permiten a los virus oncolíticos eludir las barreras biológicas en seres humanos o animales y su posterior entrada al tumor?

## 3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

En el Laboratorio de Biología Molecular de Virus de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, se han realizado estudios en los cuales se encontró que cepas rotavirales aisladas en el laboratorio infectan y lisan las líneas celulares Sp40 Ag-14 (mieloma de ratón), U-937 (linfoma histiocítico), REH (leucemia linfocítica aguda), Kato III (carcinoma gástrico), J774 (sarcoma de células reticulares), MDA y MCF-7 (adenocarcinoma de mama), PC3 (adenocarcinoma grado IV de próstata), sugiriendo que las cepas estudiadas son potenciales virus oncolíticos. Adicional a los estudios in vitro, se ha estudiado los rotavirus en un modelo in vivo, en las cuales están presentes no solo la distribución espacial de las células tumorales, si no a su vez el sistema inmune en tumores generados a partir de inocular subcutáneamente células SP2/O en ratones Balb/c, en lo denominado tumores lisogénicos. En este modelo se ha aplicado el virus en forma directa, denominada intratumoral. Sin embargo, internacionalmente se ha propuesto lineamientos que permiten evaluar un balance entre el potencial oncolítico del virus y los riesgos asociados con el uso del virus candidato a utilizarse. Por esto, es necesario hacer una revisión de la literatura respecto a determinar los artículos científicos relacionados con los métodos y técnicas utilizadas para aplicar virus oncolíticos en animales o humanos para tratar el cáncer; clasificar los virus oncolíticos que en la actualidad se utilizan para terapia oncolítica; seleccionar las técnicas utilizadas para envolver los virus y eludir de esta manera el sistema inmunológico antes que el virus llegue al tumor y seleccionar los métodos utilizados para aplicar el virus al paciente y hacer que este alcance el tumor.

## 4. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad se buscan nuevas alternativas para la prevención y opciones terapéuticas al tratamiento convencional del cáncer (radioterapia y quimioterapia). Se ha reportado que algunos virus pueden infectar, disminuir la viabilidad de células tumorales o lisarlas (oncolisis); estos virus se estudian primero in vitro, en líneas tumorales, luego in vivo en modelos animales y posteriormente en los pacientes humanos. Hasta la fecha no existe ningún reporte donde se evalué a rotavirus como potencial virus oncolítico. El objetivo del presente trabajo es hacer una revisión de la literatura respecto a determinar los artículos científicos relacionados con los métodos y técnicas utilizadas para aplicar virus oncolíticos en animales o humanos para tratar el cáncer; clasificar los virus oncolíticos que en la actualidad se utilizan para terapia oncolítica; seleccionar las técnicas utilizadas para envolver los virus y eludir de esta manera el sistema inmunológico antes que el virus llegue al tumor y seleccionar los métodos utilizados para aplicar el virus al paciente y hacer que este alcance el tumor. Lo anterior es necesario hacerlo porque algunos ensayos clínicos han demostrado que los virus oncolíticos se pueden administrar sistémicamente de forma segura y con una baja toxicidad. La administración intravenosa ofrece la oportunidad de tratar el tumor primario y la metástasis simultáneamente. No obstante, algunos estudios muestran que la eficiencia podría estar limitada por la toxicidad sobre los tejidos normales y/o la presencia de una respuesta inmune preexistente en los sujetos tratados. Por esta razón es necesario revisar los estudios que se han hecho in vivo, en tumores alogénicos y singénicos porque nos permitirá adquirir experiencia indirecta sobre técnicas y métodos que podremos tener en cuenta a la hora de aplicar el rotavirus en un animal o en un humano con metástasis. Conocer y sintetizar estos aspectos es muy importante para aplicar el rotavirus en animales o en ensayos pilotos en humanos para poder evaluar la selectividad infecciosa del rotavirus por las células tumorales y no tumorales e inferir la seguridad clínica.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. OBJETIVO GENERAL**

Analizar la literatura científica sobre los métodos y técnicas utilizadas para aplicar virus oncolíticos en animales o humanos para tratar el cáncer.

### **5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Seleccionar los artículos científicos en bases de datos Pubmed, Jstor, Ebsco, Medline, de artículos relacionados con los métodos y técnicas utilizadas para aplicar virus oncolíticos en animales o humanos para tratamiento del cáncer.
- Clasificar los virus oncolíticos que en la actualidad se utilizan para terapia oncolítica.
- Seleccionar las técnicas utilizadas para envolver los virus y eludir de esta manera el sistema inmunológico antes que el virus llegue al tumor
- Seleccionar los métodos utilizados para aplicar el virus al paciente y hacer que este alcance el tumor

## 6. MATERIALES Y METODOS

Utilizando bases de datos electrónicas, se realizó una búsqueda sistemática de literatura original y de revisión publicada entre 1990 y 2016 sobre métodos o técnicas utilizadas para el tratamiento del cáncer en animales o humanos mediante el uso de virus oncolíticos. Para esto se utilizaron plataformas de búsqueda como clinicaltrials.gov, y bases de datos como Pubmed, Jstor, Ebsco, utilizando las palabras claves “oncolytic virus”, “application oncolytic virus”, “Therapy oncolytic virus”, “oncolytic immunotherapy”, “viral oncotherapy”, “tumour targeting”, “viral vector cancer therapy”.

Los criterios de inclusión en la búsqueda de literatura fueron: literatura este comprendida entre 1990 y 2016; que el aspecto central de la literatura este representado por el uso de virus silvestres o modificados utilizados para el tratamiento del cáncer; sobre técnicas utilizadas para envolver el virus y eludir de esta manera el sistema inmunológico antes que el virus llegue al tumor; sobre métodos utilizados para aplicar el virus al paciente y hacer que este alcance el tumor, o propuestas que la literatura incluya sobre modelos para aplicar los virus oncolíticos en el tratamiento del cáncer. Criterios de exclusión: Literatura en cuyos modelos experimentales no se realizaron ensayos in vivo.

**Tabla 2. Resultado de búsqueda en bases de datos**

PALABRAS CLAVE	BASE DE DATOS		
	PUBMED	EBSCO	JSTOR
Application oncolytic virus	57	58	21
Oncolytic immunotherapy	39	91	141
Oncolytic virus	141	*1603	115
Therapy oncolytic virus	191	110	103
Viral oncotherapy	21	6	4
Viral vector cancer therapy	81	47	*16604
Virus tumour targeting	25	36	386
<b>TOTAL</b>	<b>555</b>	<b>348</b>	<b>770</b>

\* No fueron tenidos en cuenta para la revisión sistemática

De los artículos encontrados (ver tabla 2 y Anexo A) 121 cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión; de los cuales 37 artículos fueron resumidos y clasificados en el capítulo de Marco Conceptual y 84 artículos fueron clasificados y resumidos en el capítulo de resultados.

# 7. RESULTADOS

## 7.1. Métodos para aplicación de virus

Existen diversos métodos para mejorar la especificidad y la eficacia de los virus oncolíticos para tratar los diversos tipos de cáncer, a continuación se citarán los métodos encontrados en la revisión sistemática.

### 7.1.1. Células transportadoras

A la administración directa de virus oncolíticos al tumor, o por vía intravenosa u otras (intraperitoneal, intratecal), se ha encontrado la manera de infectar células del paciente o animal que sirvan como “transportadoras” de los virus. Una ventaja es que se protege al virus de la respuesta del sistema inmune, lo cual permite que haya una mayor biodisponibilidad del virus. Otra ventaja es que según el tipo de célula transportadora puede presentarse replicación viral, lo cual posibilita que haya más partículas virales que la cantidad original transducida en dichas células transportadoras(38, 39).

El tipo de célula transportadora puede variar según la etiología del tumor: epitelial, mesenquimal, células del sistema inmune: células T, dendríticas; según el tipo de tumor: si es sólido o de tipo hematopoyético. No solo se han usado células normales, también células tumorales han sido utilizadas como transportadoras, al igual que células madre (40-43).

Muthana y colaboradores (44) utilizaron como células transportadoras a macrófagos; estos fueron infectados con adenovirus e inyectados a ratones xenotransplantados con tumor de próstata, 48 horas posterior a tratamiento con docetaxel y/o irradiación, no se observó nueva proliferación del tumor post tratamiento en los ratones comparado a los que no se aplicaron macrófagos infectados, también se observó mayor supervivencia de dichos ratones.

En un estudio previo estos investigadores también utilizaron macrófagos como “transportadores” de adenovirus en donde se evidenció inhibición de crecimiento tumoral prostático y metástasis pulmonares en ratones atímicos xenotransplantados, con evidencia de infiltración en zonas hipóxicas del tumor, esto dado por 3 mecanismos: la afinidad propia de los macrófagos a regiones hipóxicas, el constructo insertado en los

adenovirus utilizando un promotor inducible por hipoxia lo cual indujo la replicación viral en el macrófago y la afinidad del adenovirus por las células tumorales prostáticas también generado por promotores específicos de próstata (45).

Estudios realizados utilizando células madre neuronales (NSCs) muestran que al infectar dichas células con un adenovirus de replicación condicional (CRAd-S-pk7) e inyectarlas intracranealmente a ratones atímicos xenotransplantados con gliomas de origen humano; presentan disminución en el crecimiento tumoral y mayor supervivencia en comparación al grupo con aplicación de adenovirus libre (46).

Estudios con células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea (BMhMSCs) de pacientes con hepatocarcinoma e infectadas con measles virus; evidenciaron que los ratones al ser implantados ortotópicamente con células de hepatocarcinoma humano, e inmunizados pasivamente con anticuerpos neutralizantes anti-measles; presentan una respuesta antitumoral aumentada respecto a los ratones no inmunizados pasivamente y a los que fueron infectados con virus libres (47).

Otros ensayos han utilizado células mesoteliales humanas (MC) como transportadoras de HSV-1 en ratones Balb/c con trasplantes subcutáneos e intraperitoneales de células tumorales de ovario, se observó que al inmunizar pasivamente con anti-HSV-1 presentaron un mayor efecto oncolítico el grupo de ratones inyectados con virus transportados por MC con respecto a los virus libres (48).

Un estudio inicial también utilizó HSV-1 pero como célula transportadora utilizó a la línea de teratocarcinoma humano (Pa-1) presentando mayor infección en regiones tumorales de ovario con respecto al HSV-1 libre (49).

Otro estudio utilizó un modelo murino de metástasis pulmonares y nodulares cuyo origen fue una línea celular de hepatoma de rata, utilizando como célula transportadora a esta línea celular al parvovirus H-1. Los resultados mostraron que las ratas tratadas con virus transportados presentaron menor generación de anticuerpos neutralizantes y supresión de eventos metastásicos con respecto a las tratadas con virus libres (50).

En un estudio clínico fueron reclutados diez pacientes que presentaban metástasis hepáticas por cáncer colorrectal primario, se administró un único ciclo de monoterapia con reovirus intravenoso TCID<sub>50</sub>  $1 \times 10^{10}$ , dicho ciclo se hizo previo a la resección de metástasis hepáticas por cáncer colorrectal por un periodo de 5 días (51).

**Figura 11. Esquema del ensayo clínico**

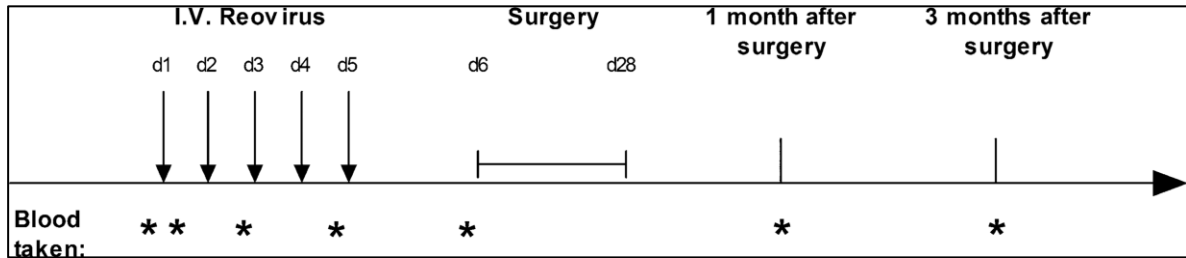


Figura tomada de Adair R. Cell carriage, delivery, and selective replication of an oncolytic virus in tumor in patients. 2014;4(138).

Como células transportadoras usaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Al comparar muestras de sangre, tejido tumoral resecado y tejido normal, se observó la presencia selectiva del reovirus en el tumor y la protección por la célula transportadora brindada al reovirus en la circulación (51).

Power y colaboradores utilizaron una línea celular de carcinoma de colon murino (CT26) como transportador de VSV, usando como modelo ratones balb/c generaron tumores en pulmón por inyección de células CT26 ( $3 \times 10^5$ ) y tumores subcutáneos en flancos ( $10^6$ ). Fueron tratados 3 días por semana por 4 semanas con PBS, viriones desnudos ( $5 \times 10^8$  PFU) o con células transportadoras de VSV ( $10^6$ ). Se efectuó inmunización pasiva del VSV en los ratones por medio del suero obtenido de un ratón inyectado con VSV. Se observó en el grupo de ratones inyectados con VSV desnudo una baja infiltración del virus en los tumores, comparado a los inyectados con VSV en célula transportadora, al igual que una disminución en el crecimiento del tumor. Al utilizar otra célula transportadora: una línea celular de leucemia murina (L1210) se observó mayor diseminación: en pulmones y cavidad abdominal, pero la presencia del VSV se observó mayormente en las regiones tumorales en pulmón y subcutáneo (52).

Un reciente estudio utilizó un adenovirus de replicación condicional que expresa hialuronidasa soluble (ICOVIR17) en un modelo murino de glioblastoma multiforme (GBM) nodular, obtenido por implantación intracraneal de células GBM humanas (U87). Utilizaron células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (MSC) como células transportadoras del adenovirus ICOVIR17 y a su vez encapsularon dichas MSC en matrix extracelular sintética biocompatible (sECM), los experimentos mostraron una regresión en el crecimiento tumoral y aumentó de la supervivencia en el grupo en el



que se inyectaron MSC-sECM- ICOVIR17 con respecto a los grupos inyectados con MSC-sECM, ICOVIR17 o PBS; en donde estos dos últimos grupos presentaron una supervivencia similar (53).

**Figura 12. Supervivencia de modelos murinos según tratamiento administrado.**

Days	0	30	40	50	60	70	80	Therapy	Median survival
PBS	4	2	1	0	0	0	0	PBS	34.5
sECM-MSC	4	2	1	0	0	0	0	sECM-MSC	31.5
ICOVIR17	4	1	1	0	0	0	0	ICOVIR17	29
MSC-ICOVIR17	6	6	4	2	1	1	0	sECM-MSC-ICOVIR17	45.5

Figura adaptada de Martínez-Quintanilla J. Encapsulated Stem Cells Loaded With Hyaluronidase-expressing oncolytic Virus for Brain Tumor Therapy. *Mol Ther.* 2014;23(1):1–11.

### 7.1.2. Encapsulación: Liposomas y polímeros

Otro método para aumentar la eficacia y eficiencia de infección de virus oncolíticos a tumores en modelos in vivo es la encapsulación con liposomas y formación de complejos con polímeros; esto protege a los virus del sistema inmune del huésped, y mejora la especificidad del virus hacia el tumor. La unión a polímeros puede efectuarse por conjugación química entre proteínas de la cápside o por ingeniería física por medio de interacciones electrostáticas (54).

Los polímeros también son modificados en su cubierta con proteínas tipo receptor, proteína G o anticuerpos con blancos que aumentan la afinidad por las regiones tumorales (55).

Estos métodos han mostrado aumento en el tiempo de circulación en sangre, disminución en la interacción con componentes sanguíneos (anticuerpos neutralizantes, complemento, entre otros) y mayor biodisponibilidad del virus en tumores (56-61).

Estudios han mostrado que el uso de aptámeros (DNA, fracción Fc) ligados a la cápside viral, bloquean la interacción con anticuerpos neutralizantes al igual que aumentan su infectividad a pesar de la presencia de dichos anticuerpos (62).

Yang y colaboradores usaron adenovirus recombinante (Ad-hEndo) encapsulado en liposomas (PEG-PE) y lo aplicaron en un modelo murino de cáncer de ovario (por medio de la línea celular SKOV-3: cistocarcinoma de ovario humano ), se observó que la administración sistémica en ratones con cáncer de ovario Ad-E/Lipo ( $1 \times 10^8$  p.f.u.), no indujo una respuesta de anticuerpos considerable, si una disminución en el tamaño tumoral (con aumento de eventos apoptóticos al examinar muestras tumorales) y tiempos de sobrevivida mayores de los ratones con respecto a los grupos control (63).

**Figura 13. Tamaño tumoral y sobrevivencia de modelos murinos según tratamiento administrado**

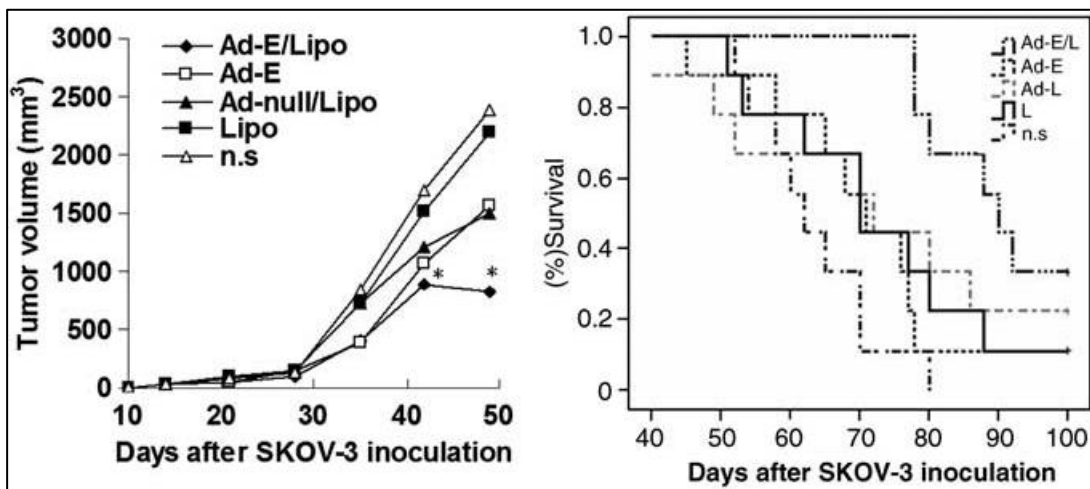


Figura tomada de Yang L. Suppression of ovarian cancer growth via systemic administration with liposome-encapsulated adenovirus-encoding endostatin. *Cancer Gene Ther.* 2010;17(1):49–57.

En un estudio se modificó el tropismo natural de un adenovirus al utilizar un polímero (Poly-(2-hidroxipropil)metacrilamida (pHPMA) unido a un ligando (mEGF: factor de crecimiento epidermal murino) para redirigirlo a células tumorales que sobreexpresaban el receptor del mEGF: EGFR. Ratones desnudos fueron implantados con células SKOV-luc (línea celular de cáncer de ovario humano) intraperitonealmente ( $1 \times 10^7$ ) y 96 horas después tratados con 3 dosis (intervalo de 72 horas entre dosis) de  $5 \times 10^{10}$  partículas virales AD5WT, pHPMA-Ad5WT (adenovirus ligado al polímero) o mEGF- pHPMA-Ad5WT (adenovirus-polímero-factor de crecimiento epidermal) los resultados mostraron que ratones tratados con ad5WT presentaron alta frecuencia de adhesiones peritoneales y obstrucciones intestinales subagudas, por lo que se requirió eutanasia en el 20% de los ratones. Mientras que los tratados con o mEGF- pHPMA-Ad5WT

presentaron una mejora significativa en eventos como adhesiones peritoneales y obstrucción intestinal, sin embargo no se observó diferencia en el efecto antitumoral con respecto al Ad5WT (64).

Un estudio similar utilizó el polímero metoxipolietilenglicol amino (MPEG-NH<sub>2</sub>, Mw 5000) unido a adenovirus en un modelo xenograft murino con células HT1080 y A549 (fibrosarcoma humano y adenocarcinoma de pulmón respectivamente), el polímero sirve como protección del sistema inmune e interacción con anticuerpos séricos, se observó una relación de localización viral de tumor/higado mucho mayor al control con adenovirus desnudo inyectado (65).

Un estudio utilizó vaccinia virus atenuado (GLV-1h68) el cual fue colocado en un polímero de proteína similar a la elastina de seda: silk-elastin-like protein polymer (SELP) en un modelo murino de carcinoma anaplásico de tiroides humano (línea celular 85505c) establecido al inyectar  $5 \times 10^6$  células en un flanco subcutáneamente en ratones atómicos.

Se observó una mayor expresión viral en el tumor con respecto a los ratones con virus libres inyectados. Se evidenció también disminución del volumen tumoral entre los 5 y 22 días post inyección pero sin una diferencia estadísticamente significativa con respecto a los ratones con virus libres inyectados (66).

Otro ensayo utilizó un compuesto L-carnosina, el cual se ha mostrado previamente que tiene un efecto anti-proliferativo celular; realizaron unión electrostática con la cápside de un adenovirus y se evaluó en un modelo xenograft murino de cáncer de colon y pulmón, en donde se observó reducción en el crecimiento del tumor, el cual según los ensayos in vitro fue causado por inducción de apoptosis de las células tumorales (67).

Recientes ensayos combinaron dos métodos desarrollados para virus oncolíticos: la ingeniería genética de measles virus (MV-NPL: genes N, P,L silvestre del MV tipo salvaje) y el encapsulamiento multicapa del virus: colocación capa por capa de polímeros iónicos. Se comparó su actividad antitumoral en modelo murino consistente en la inyección subcutánea en flanco de  $1 \times 10^6$  células HEP2 (cáncer laríngeo humano),  $3 \times 10^6$  células A549 (cáncer de pulmón humano), o  $3 \times 10^6$  células WiDr (cáncer de colon humano). Los virus se inyectaron una vez por semana dos días después de la inoculación tumoral ( $2.5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>) En los 3 experimentos se observó disminución del volumen tumoral entre la

primera y tercera semana comparado a los ensayos con inyección de virus libres y ratones control tratados con suero (69).

Un grupo de investigadores utilizó micropartículas tumorales (T-MP) que son fragmentos vesiculares de membrana celular de células tumorales para encapsular y transportar adenovirus. Utilizaron un modelo tumoral murino al implantar subcutáneamente en flanco células A549  $1 \times 10^6$  (carcinoma de pulmón humano), 5 días después fueron tratados con PBS, MPs ( $1 \times 10^6$ ), adenovirus ( $1 \times 10^8$  partículas virales), OA-MP ( $1 \times 10^6$ ). Mediciones del tumor cada 3er día. Se observó mayor sobrevida en el grupo de ratones tratados con OA-MP respecto a los tratados solo con OA, al igual que un menor desarrollo del volumen tumoral. Del estudio con OA-MPs se encontraron varias ventajas: disminuir la respuesta inmune por contacto con anticuerpos del huésped, T-MPs no son limitados por un receptor viral específico que medie su entrada al tumor, y los T-MPs permiten la liberación de adenovirus en el núcleo de células tumorales así como en células stem-like tumorales (68).

**Figura 14. Sobrevida y volumen tumoral de modelos murinos según tratamiento administrado.**

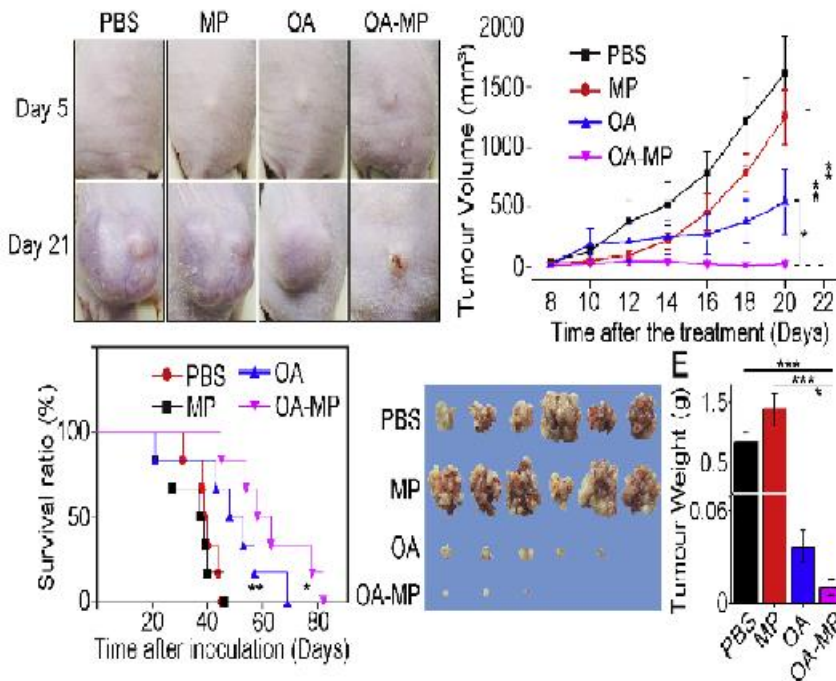


Figura tomada de Ran L, et al. Delivery of oncolytic adenovirus into the nucleus of tumorigenic cells by tumor microparticles for virotherapy. *Biomaterials*. 2016;89:56–66.

**Figura 15. Microscopia electrónica 24 horas post-infección oncoviral de células A549.**

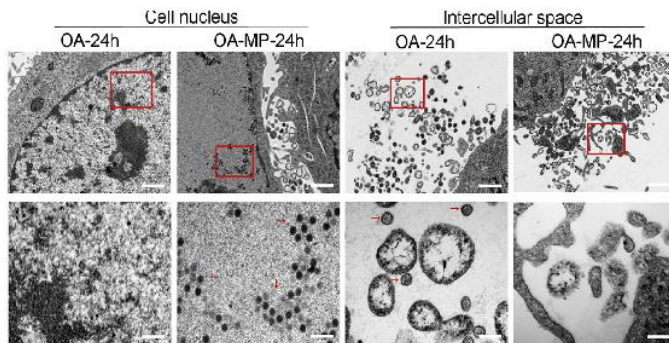


Figura tomada de Ran L, et al. Delivery of oncolytic adenovirus into the nucleus of tumorigenic cells by tumor microparticles for virotherapy. *Biomaterials*. 2016;89:56–66.

### 7.1.3. Ultrasonido

El ultrasonido es un método ampliamente aplicado en imagenología médica para el diagnóstico de patologías, sin embargo estudios han llevado a esta metodología a emplearse en promisorias estrategias de tratamiento. Con respecto al tratamiento tumoral con virus oncolíticos, se sabe que la vía de administración y las barreras biológicas son limitaciones para un mayor uso en clínica de los virus. El ultrasonido es un nuevo método que busca mejorar el transporte de los virus a su objetivo tumoral. Los agentes de contraste por ultrasonido (UCAs) o microburbujas (MBs) se están utilizando como portadores potenciales de ácidos nucleicos, RNAs de interferencia, drogas, proteínas y recientemente virus oncolíticos. (70, 71)

El ultrasonido inicia a una frecuencia de 20kHz, lo cual se encuentra fuera del rango audible humano el cual se encuentra entre 20Hz y 20kHz.

Las ondas ultrasónicas viajan a mayor velocidad en un medio sólido (ej. Tejido óseo) que en un medio gaseoso. A la interacción de ondas ultrasónicas con burbujas (esferas de gas generadas en el medio) en una fase líquida o similar, se le denomina cavitación.

**Figura 16. Mecanismos de sonoporación por microburbujas**

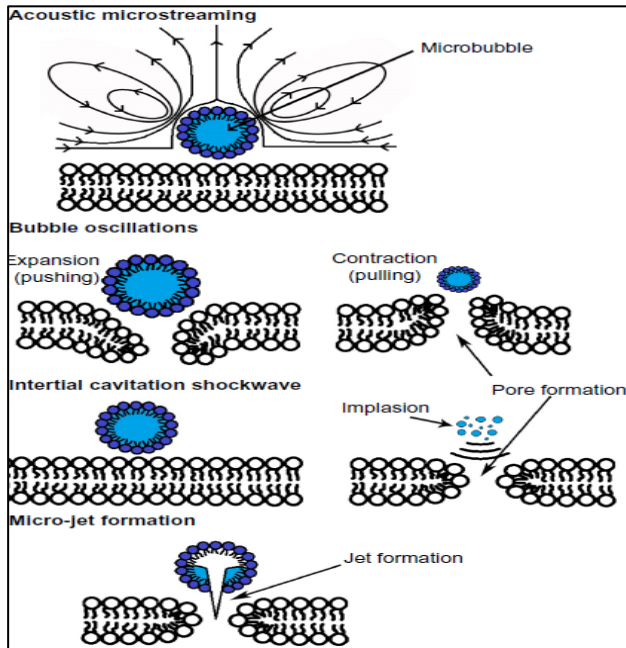


Figura tomada de Nande R. Oncolytic Virotherapy Dovepress Ultrasound-mediated oncolytic virus delivery and uptake for increased therapeutic efficacy: state of art. *Oncolytic Virotherapy*. 2015;4:193–205.

En la figura se muestra como la microburbuja es dirigida hacia la membrana celular de determinada célula por efecto de las ondas de ultrasonido, esto genera un efecto de “empuje y jale” de la microburbuja con la membrana, y por cizallamiento, se generan poros en la membrana celular y la microburbuja libera su contenido.

Las microburbujas o UCAs son microesferas llenas de gas con un diámetro entre 1-10µm encapsuladas por una membrana estabilizada y biocompatible. Para el gas del interior se emplean gases inertes que favorecen la vida media de la microburbuja. Existen microburbujas comerciales, como SonoVue (SV) y Artison microbubble; son unas UCAs que están formadas por una suspensión acuosa y en su interior un gas inerte. La dosis de MBs aprobada por la FDA para un paciente es entre  $10^9$ - $10^{10}$  MBs en 1-2mL para inyección en bolo IV (71).

Un estudio empleó ultrasonido para favorecer la internalización del virus oncolítico Herpes Simplex tipo 1 deficiente para el gen neurovirulento  $\gamma_1$ 34.5 (HSV-1 RH2) en células de carcinoma escamoso oral (SCC). Las células fueron expuestas a ultrasonido en presencia o ausencia de microburbujas, a lo que no se observó pérdida de la

viabilidad celular entre las tratadas con US y las US+ MB. Además se observó un mayor número de placas en US+ MB con respecto al control (72).

En otro estudio también del mismo grupo de investigación, se utilizó como modelo al virus oncolítico Herpes Simplex tipo -1 deficiente para el gen neurovirulento  $\gamma_{134.5}$  (HSV-1 RH2). Las células de carcinoma escamoso oral (SCC) fueron infectadas por HSV-1 RH2 (una inyección intratumoral de  $1 \times 10^6$  PFU, cuando los tumores alcanzaron 5mm de diámetro) en presencia (mezcla de  $1 \times 10^6$  pfu +  $5 \times 10^6$  MBs) o ausencia de microburbujas (MBs). En otro ensayo las células SCC fueron inoculadas subcutáneamente en ratones desnudos ( $1 \times 10^6$  células SCC), Se observó que había mayor número de partículas virales en los ratones con tumores tratados con ultrasonido (US, exposición por 10 segundos) y virus que en el grupo tratado solo con virus o control con PBS. Se observó también supresión del crecimiento tumoral en el grupo de ratones tratados con HSV-1 RH2 + US + MBs con respecto a los grupos control (73). Otro grupo de investigadores utilizó una “copa polimérica (cups)” diseñada por ellos, como alternativa a las microburbujas comerciales para inducir fenómenos de cavitación entre virus y células tumorales al aplicar ultrasonido (US). En modelos xenograft murinos con líneas celulares de cáncer de ovario humano (SKOV  $5 \times 10^6$ ) o de carcinoma hepático humano (HepG2  $5 \times 10^6$ ), se coinyectaron vía intravenosa en vena de la cola cups (50uL a 25mg/mL) y vaccinia virus ( $1 \times 10^5$  en 50uL) cuando los tumores alcanzaron un volumen entre 40-100  $\text{mm}^3$ , después se expusieron a US. Se observó que la expresión de vaccinia virus (VV) en los tumores generados por SKOV-3 y HepG2 aumentó en 3 y más ordenes de magnitud, y se presentó disminución en el tamaño tumoral en el grupo tratado con VV+ cups+US en comparación al grupo control no tratado con cups ni US (74).

#### **7.1.4. Coadyuvantes**

Los virus oncolíticos han estado siendo utilizados como coadyuvantes a terapias convencionales como cirugía, quimio, inmuno y radioterapia; sin embargo cada vez más el enfoque terapéutico se centra en aumentar la eficiencia de la terapia oncoviral con otras terapias tradicionales; lo que indica que la terapia con virus oncolíticos tiene ahora un rol más preponderante en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer(75-78).

Entre los tratamientos que mejoran la eficacia oncoviral se encuentran medicamentos inmunomoduladores que disminuyen la respuesta inmune, otros que generan disrupción de la matrix extracelular del tumor, facilitando la entrada del virus, medicamentos que saturan receptores en el huésped encargados de la internalización del virus. Al igual que terapia combinada oncolítica viral y antiangiogénica sinergizan en el efecto deseado que es la regresión y eliminación del tumor (79). También el uso de dos tipos diferentes de virus ha demostrado que mejora la actividad oncolítica del segundo virus aplicado (80-84)

Un ensayo combinando gemcitabina y administración de reovirus mostró que en un modelo murino C57BL/6 (inyección intraperitoneal de  $3 \times 10^6$  células ID8: tumor ovárico de origen epitelial murino) se retardaba la aparición de carcinomatosis peritoneal y se prolongaba la supervivencia; con respecto a los ratones tratados solo con gemcitabina o reovirus (85).

Otros experimentos realizados en modelo de ratas inmunocompetentes con generación de gliomas por implantación intracraneal de células de glioma de rata (D74/HveC), donde un grupo fue tratado con un péptido angiostático cRGD  $30 \mu\text{g}$  4 días antes del tratamiento con virus herpes simple atenuado  $1 \times 10^7$  pfu (hrR3), el cual se realizó 7 días post-implantación. Se observó en el grupo de tratamiento con cRGD- hrR3 una disminución de la infiltración leucocitaria, en la permeabilidad vascular del tumor y aumento en la sobrevivencia de las ratas (86).

**Figura 17. Porcentaje de sobrevivencia de ratas según el tratamiento aplicado**

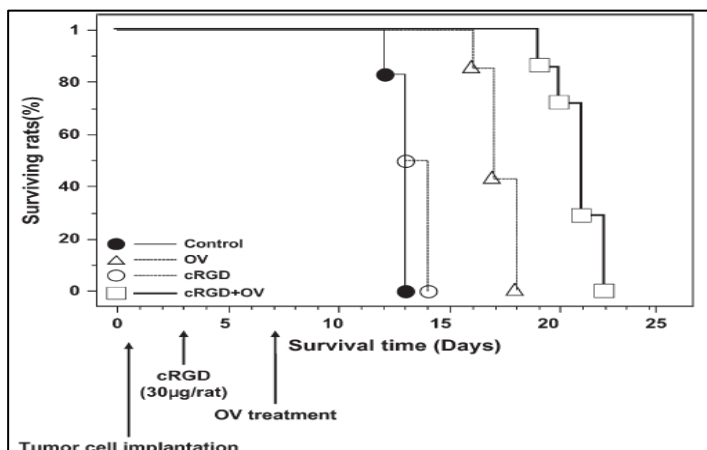


Figura tomada de Kurozumi K, et al. Effect of tumor microenvironment modulation on the efficacy of oncolytic virus therapy. J Natl Cancer Inst. 2007;99(23):1768–81.



Otro estudio evidenció que al tratar un modelo tumoral de ratones con carcinomatosis peritoneal (células MC38-luc de cáncer de colon murino), un coctel modulador de quimioquinas (CKM) 200 uL (IFN- $\alpha$ , poli i:c inhibidor de Cox-2) y la aplicación de vaccinia virus atenuado y con expresión de la quimioquina CXCL11 (vvDD-CXCL11) se observó una mayor respuesta inmune en el tumor, dado por aumento en la concentración de células natural killer, linfocitos T CD8, disminución de la carcinomatosis peritoneal y aumento en la sobrevivencia en los ratones tratados con vvDD-CXCL11 + CKM, con respecto a los grupos tratados solo con vvDD-CXCL11, CKM o PBS (87).

**Figura 18. Esquema de tratamiento y sobrevida de los modelos murinos por tratamiento administrado**

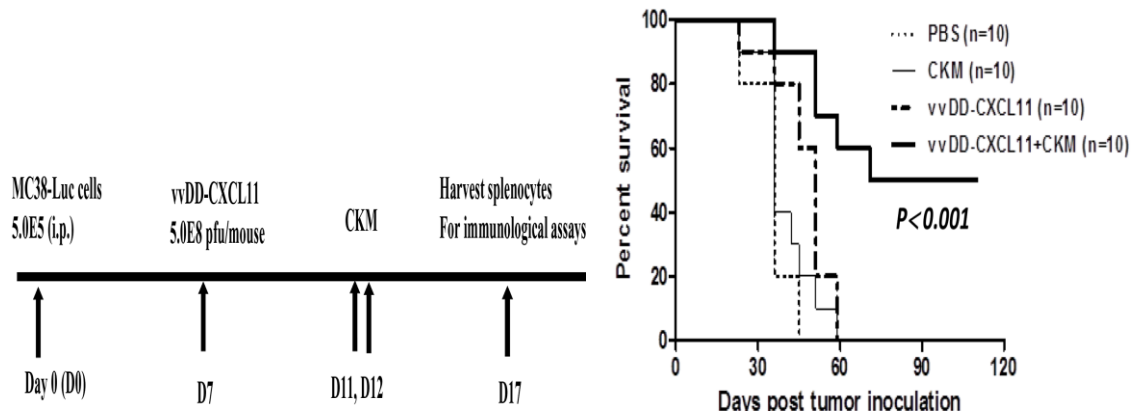


Figura adaptada de Francis L, et al. Modulation of chemokines in the tumor microenvironment enhances oncolytic virotherapy for colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016;7(16):22174–85.

Una investigación en 3 modelos murinos de tumores humanos [células de Sarcoma de tejido blando humano (HSTS26T) y tumores de melanoma humano (Mu89) fueron implantadas en patas y en región dorsal de ratones inmunodeficientes (SCID). Células de adenocarcinoma de páncreas humano (L3.6pl) fueron cultivadas ortotópicamente en el páncreas de ratones SCID, se iniciaron esquemas de tratamientos cuando los tumores alcanzaron entre 4-6 mm de diámetro], en donde se aplicó una dosis intraperitoneal de losartan al día por 2 semanas (20mg/kg/día). Se inyectaron 10uL ( $3.6 \times 10^{13}$  nanoparticulas/mL) de herpes simplex virus vía intravenosa (vena de la cola). Se observó reducción en el colágeno estromal tumoral, al igual que menor volumen tumoral y mayor tasa de infección viral en los tumores de los ratones tratados con losartán (88).

Otro estudio aplicando el conocimiento de los puntos de control inhibitorio en la respuesta inmune, utilizaron constructos y modificaron genéticamente a una cepa de measles virus

con CTLA-4 y PD-L1(MV-aCTLA-4 y MV-aPD-L1) , posteriormente en un modelo de ratones de melanoma (obtenida al realizar implante subcutáneo de  $1 \times 10^6$  células B16) se aplicaron  $2 \times 10^6$  ciu de MV intratumoral por 4 días, y un esquema de anticuerpos anti-CTLA-4 o anti-PD-L1 intraperitoneal por 4 días cada 3er día (ver figura), a los modelos murinos que recibieron tratamiento con MV no modificados genéticamente. Se observó que tanto los modelos murinos tratados con anticuerpos + MV como los tratados con MV-aCTLA-4 y MV-aPD-L1 presentaban respuestas similares, aumento en la sobrevida, y lento crecimiento (la medición del volumen tumoral se realizó al día 14 post implantación subcutánea del tumor) (89).

**Figura 19. Esquema de tratamiento, volumen tumoral y sobrevivencia de modelos murinos según tratamiento**

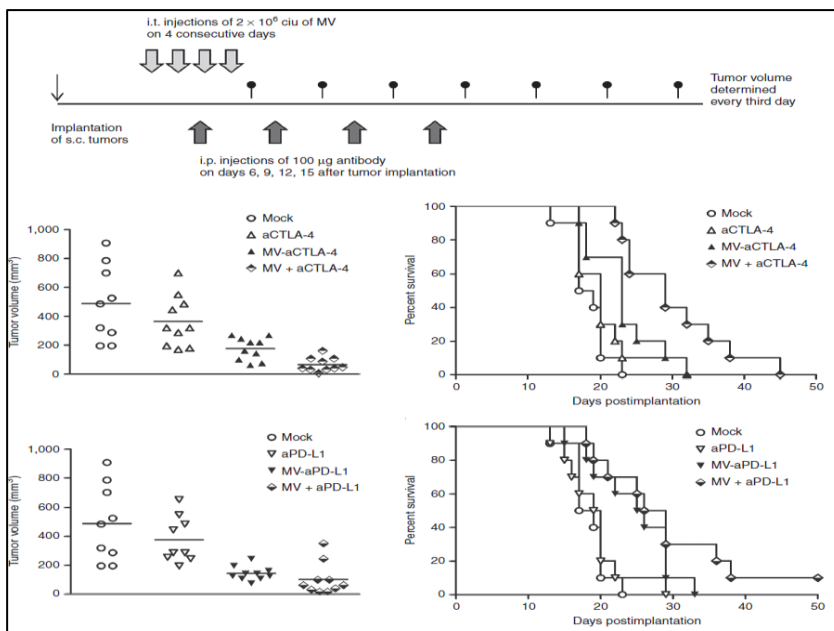


Figura adaptada de Engeland CE, et al. CTLA-4 and PD-L1 checkpoint blockade enhances oncolytic measles virus therapy. *Mol Ther.* 2014;22(11):1949–59.

Estudios de terapia combinada con diversos virus oncolíticos en modelos murinos de tumores humanos muestran el aumento de la respuesta antitumoral generada tanto por el virus como por el sistema inmune; sin embargo el efecto dual del sistema inmune como barrera para los virus oncolíticos o de sinergia terapéutica depende del tipo de virus utilizado, las modificaciones genéticas realizadas y coadyuvantes empleados (90,91).

### 7.1.5. Terapia fotodinámica

La terapia fotodinámica es un tipo de tratamiento antitumoral poco invasivo; se necesita un fotosensibilizador captado por el tejido tumoral, luego la aplicación de luz a una determinada longitud de onda, y la activación del fotosensibilizador genera la producción de radicales libres de oxígeno (ROS). Esto permite que donde se localice el fotosensibilizador y se active, generara una considerable producción de ROS que en el caso de encontrarse en una región tumoral puede inducir mecanismos de muerte celular (92,93).

Un estudio empleó terapia fotodinámica (PDT) en modelos murinos de neuroblastoma (línea celular NXS2  $2 \times 10^6$ ) y carcinoma escamoso de cabeza y cuello (línea celular FaDu  $5 \times 10^6$ ) junto a la aplicación del virus oncolítico vaccinia ( $10^8$ pfu). El fotosensibilizador 2-[1-Hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide-a ( $0.45 \mu\text{mol}/7\text{kg}$ ), fue aplicado i.v.; y a las 24 horas los tumores fueron estimulados con luz a una longitud de onda de 665 nm. La combinación de PDT y terapia oncolítica viral evidenció inhibición del crecimiento tumoral, mayor número de partículas virales en el tumor y disminución del flujo vascular al interior del tumor con respecto a los grupos control tratados con monoterapia (94).

Otro estudio utilizó un adenovirus (ad-GFP) y lo modificaron genéticamente para que expresara un fotosensibilizador [KillerRed® el cual es una proteína roja fluorescente que genera radicales libres de oxígeno (ROS) a la irradiación con luz verde] utilizando como promotor la transcriptasa reversa de la telomerasa humana (ad+KillerRed=Telomekiller). Evaluaron el efecto in vivo con un modelo murino de metástasis en nodo linfático; para esto implantaron  $3 \times 10^6$  células HCT116 en 25uL de PBS con 25uL de matrigel en la capa submucosa del recto; a los 10 días se inyectaron  $10^8$ pfu/50uL de Telemekiller directamente en los tumores rectales. Tres días después se realizó laparotomía y los nódulos para-aórticos y para-iliares que expresaron GFP (proteína verde fluorescente) fueron irradiados con láser a  $300\text{mW}/\text{cm}^2$ . Se observó una respuesta sinérgica entre los adenovirus y la producción de ROS para eliminar el tumor. Las micrometástasis en los nódulos fueron eliminadas posterior al tratamiento de irradiación con láser (95).

### 7.1.6. Ingeniería Genética

La ingeniería genética es la metodología más utilizada por los investigadores de virus oncolíticos; debido a los múltiples pasos y mecanismos en los que se puede intervenir para mejorar la eficiencia oncolítica viral; entre los que se encuentran: genes involucrados en la replicación viral, genes que codifiquen a proteínas proapoptóticas, a factores de crecimiento, a ligandos para interactuar con receptores presentes en las células tumorales, a proteínas inhibidoras del ciclo celular, anticuerpos, quimioquinas y citoquinas (96-102).

Estudios que han aprovechado el perfil antigénico del tumor para diseñar virus con blanco a los antígenos tumorales mayormente expresados y aumentar así su especificidad por las células tumorales (103).

Un grupo de investigadores generó un vaccinia virus recombinante (OVV- CXCR4) que codificaba a un antagonista de CXCR4 el cual es un receptor de quimioquina (SDF-1), en un modelo singénico de carcinoma de mama receptores triple negativo. Se observó una mayor concentración viral en el tumor y una tasa de crecimiento tumoral menor en los ratones tratados con OVV- CXCR4 que los tratados con OVV nativo (104).

Un estudio utilizó un adenovirus y modificó la proteína IX de su cápside por la proteína inductora de apoptosis TRAIL, en un modelo murino de adenocarcinoma de mama se observó mayor afinidad viral por las células tumorales que expresaban receptores de TRAIL (DR4 y DR5), también en este grupo tratado se observó aumento de marcadores apoptóticos como caspasa 3, indicando la activación de esta vía de apoptosis (105).

Otro estudio empleó el virus measles (MV) al cual modificaron genéticamente para que expresara el factor estimulante de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF) En un modelo murino de adenocarcinoma de colon (células MC38cea las cuales expresaban antígeno carcinoembrionario humano CEA, lo cual favorece la interacción con el virus modificado), se observó aumento de la infiltración linfocitaria, aumento de la sobrevivencia en los ratones tratados con el virus MV-GMCSF, con respecto al grupo control tratados con virus no modificado (106).

Menotti y colaboradores utilizaron un virus oncolítico herpes simplex (HSV) y lo modificaron genéticamente al reemplazar un fragmento (Ig-folding core) en el sitio de unión- receptor de la glicoproteína gD del virión a por una Anticuerpo anti-HER-2 de

cadena sencilla, obteniendo al transcribirse y traducirse una proteína quimera cuyo objetivo era interactuar con los receptores HER-2 sobreexpresados en células tumorales de carcinoma de ovario SK-OV-3 (Her-2 (+)) implantadas en ratones atímicos. Se observó una marcada inhibición y regresión del tumor en los ratones tratados con el HSV modificado, con respecto al control de virus silvestre y a los ratones con implante subcutáneo de células de cáncer mamario HER-2(-), SJ-Rh4 (107).

En otro estudio se diseñó un virus de estomatitis vesicular quimérico, evitando su neurotoxicidad natural al reemplazar la glicoproteína de envoltura del VSV (G), por la glicoproteína del virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV-GP), pero aun conservando su actividad oncolítica. El virus rediseñado RVSG-GP fue administrado en un modelo murino de tumor intracraneal (por inyección de  $3 \times 10^5$  células U87-RFP de glioma humano). A los 10 días del implante se inyectaron  $10^8$  PFU de r VSV-GP. Se observó regresión tumoral, y mayor infiltración viral en las áreas de tumor con respecto a los ratones tratados con rVSV (108).

Un grupo de investigación empleó un virus Newcastle disease recombinante (rNDV) modificándolo al insertar genes para interleucina 2 (IL-2) y el ligando inductor de apoptosis relacionado al factor de necrosis tumoral (TRAIL): rNDV-IL-2-TRAIL. Se observó inducción en la proliferación de linfocitos CD4+ y CD8+, inhibición en el crecimiento tumoral en modelos murinos de carcinoma hepatocelular y melanoma tratados con rNDV-IL-2-TRAIL, con respecto al grupo tratado con NDV no modificado (109).

Otro grupo de investigadores también utilizó NDV y lo modificó genéticamente al insertar IL-2 y antígenos asociados a tumor (TAA). Ratones desnudos fueron implantados con células CT26 de carcinoma de colon murino, a los 12 días fueron tratados con NDV modificado intratumoralmente cada dos días para un total de cuatro dosis. Se presentó un crecimiento tumoral lento con casos de regresión tumoral y también un aumento en la producción de citoquinas en los ratones tratados con NDV recombinante, comparado con los ratones tratados con NDV no modificado (110).

Ensayos realizados en adenovirus modificados genéticamente expresando un anticuerpo monoclonal específico para CTLA-4 mostraron elevadas concentraciones del anticuerpo en los tumores de adenocarcinoma epitelial en modelos murinos desnudos, se generó en el tumor producción de citoquinas, aumento de la actividad apoptótica, disminución del

volumen tumoral, en comparación al grupo que recibió tratamiento con el adenovirus oncolítico no modificado con CTLA-4 (111).

Investigadores utilizaron el virus oncolítico vaccinia con actividad replicativa competente (VACV), modificado genéticamente para que codificara a GLAF-1, el cual traduce a un anticuerpo de cadena sencilla que está dirigido contra el factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) de humanos y ratones. Al aplicar por vía intravenosa el VACV modificado a modelos tumorales xenograft murinos (líneas celulares PANC-1: carcinoma ductal pancreático humano, A549: carcinoma de pulmón humano, implantadas  $5 \times 10^6$  de cada línea subcutáneamente en flancos de ratones atímicos), se observó disminución en la vasculatura tumoral, regresión del volumen tumoral, con respecto a los ratones tratados con VACV no modificado (112).

Otros ensayos utilizaron el virus oncolítico herpes simplex (HSV) modificado: NV1034, el cual codifica para el factor estimulante de colonias granulocito macrófago murino (GM-CSF). Se aplicó a modelos murinos de carcinoma colorrectal (células CT26) y hepatoma murino (células Hepa 1-6); células inyectadas subcutáneamente a ratones Balb/c y C57L7J respectivamente. Resultados mostraron mayor infiltración tumoral, sin embargo en ratones con depleción de linfocitos CD4+ y CD8+ se observó un efecto antitumoral similar entre el grupo de ratones tratado con el virus NV1034 y NV1023 (HSV sin expresión de GM-CSF) (113).

Investigaciones realizadas en el virus oncolítico vaccinia (VACV), mostraron que al modificar el virus para que codificara un anticuerpo de cadena sencilla anti-factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF): GLV-5b451; eliminaba a las células tumorales (ensayos in vitro) de diferentes tipos de cáncer canino: carcinoma y adenoma mamario (MTH52c y ZMTH3 respectivamente), sarcoma de tejidos blandos (STSA-1) y carcinoma de próstata (CT1258). En un modelo xenograft murino de sarcoma de tejidos blandos (implante subcutáneo de  $2 \times 10^6$  células STSA-1), al administrar a las 4 semanas post-implantación por vía intravenosa (vena lateral de la cola) una sola vez el virus GLV-5b451 ( $1 \times 10^7$  pfu in 100  $\mu$ L de PBS), se observó inhibición en el crecimiento tumoral y reducción de su tamaño; también disminución en la neo-angiogénesis tumoral, comparado con los grupos control (114).

Kasai y colaboradores emplearon el virus herpes simplex tipo 1 (HSV1) modificado (MGH2.1) que expresa dos transgenes activadores de profármacos, ciclosfosfamida

activador de citocromo P4502B1 (CYP2B1) y CPT11 activador de carboxilesterasa humana secretada (shiCE), los resultados mostraron que las prodrogas eran citotóxicas para las células de glioma humano, pero no para células normales. La inyección intracraneal de MGH2.1 en ratones balb/c no indujo una reacción inflamatoria aguda. La inoculación intracraneal no indujo letalidad a  $10^8$  pfus en ausencia de prodrogas y de  $10^6$  pfus en presencia de estas; la supervivencia de los ratones fue medida por 9 semanas (115).

Otro estudio utilizó un virus oncolítico recombinante, el herpes simplex virus (HSV) con expresión de la enzima bacteriana condroitinasa ABC (Chase -ABC) la cual remueve los glicosaminoglicanos condroitin-sulfato de los proteoglicanos. Se utilizaron modelos murinos subcutáneos e intracraneal de glioma, se observó aumento en la propagación del virus intratumoralmente, inhibición del crecimiento tumoral y aumento de la supervivencia del grupo de ratones tratados con el HSV- Chase-ABC, respecto al grupo tratado con los virus no modificados (116).

Un grupo de investigadores obtuvo un adenovirus recombinante por evolución dirigida; para realizar este ensayo utilizaron serotipos de adenovirus de subgrupos B-F, fueron agrupados y se realizaron 2 pasajes en cultivos sub-confluentes a un ratio de partícula viral por célula de aprox. 200. El objetivo era promover la recombinación entre los diferentes serotipos. Se utilizaron las líneas celulares: HT-29 adenocarcinoma de colon, Panc-1 cáncer de páncreas humano, MDA231 adenocarcinoma de mama humano.

Al final del proceso de evolución dirigida (figura 14) obtuvieron un adenovirus recombinante ColoAd1 siendo este más selectivo y potente que sus predecesores. Evaluaron su respuesta en un modelo xenograft murino de cáncer de colon con metástasis hepática ( $2 \times 10^6$  células HT-29 fueron aplicadas por medio de catéter a la vena porta), a los 16 días post-aplicación de células tumorales, se inyectaron los virus ColoAd1  $1 \times 10^{11}$  partículas virales en la vena de la cola; 15 días después los ratones fueron sacrificados. Se observó disminución en el marcador sérico tumoral CEA (antígeno carcinoembrionario), un crecimiento tumoral menor y mayor infiltración viral en tumor con respecto los grupos control (117).

**Figura 20. Representación del proceso de evolución dirigida**

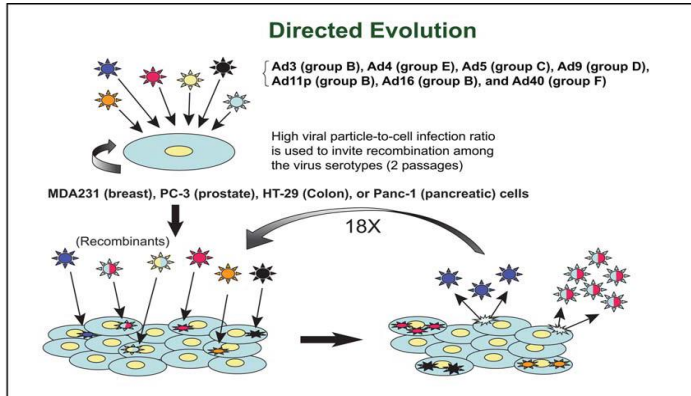


Figura tomada de Kuhn I, et al. Directed evolution generates a novel oncolytic virus for the treatment of colon cancer. PLoS One. 2008;3(6):1–11.

Foloppe y colaboradores generaron un virus vaccinia (VV) que expresaba un gen suicida de fusión (FCU1) derivado de los genes uracil-fosforibosiltransferasa y citosina deaminasa de levadura. En un modelo de cáncer de colon humano, por implante subcutáneo en ratones desnudos ( $5 \times 10^6$  células LoVo), a la administración sistémica de la prodroga 5-fluorocisteína (5-FC) [administrada por vía oral a 100mg/kg al 7mo día post-inyección viral, 2 veces al día por 3 semanas] se observó disminución en el crecimiento del tumor en ratones tratados con VV-FCU1 ( $1 \times 10^6$  pfu inyectados por vía intravenosa en vena de la cola al alcanzar los tumores un volumen entre  $50-70 \text{ mm}^3$ ) comparado con el grupo de ratones tratado solo con 5-FC sin aplicación del virus, o con el grupo tratado con 5-FC y la aplicación del virus VV sin modificación genética (118).

### 7.1.7. microRNAS

Los miRNAs son pequeños RNAs no codificantes que varían entre 20-25 nucleótidos de longitud, ejercen un papel importante en la regulación génica, actúan al unirse a la región no traducida 3'UTR del RNA mensajero. Al unirse a la región 3'UTR del mRNA reclutan un complejo de proteínas que generan represión transcripcional o clivaje del mRNA según el grado de complementariedad del miRNA con la región 3'UTR. Se sabe que los tumores presentan una variación en el perfil de miRNAs con respecto a tejidos normales,



en donde según el caso particular puede un grupo de miRNAs estar sobre-expresados en un tumor con respecto al tejido normal.

Un estudio buscó generar una mayor especificidad de tejido por parte de un adenovirus (Ad); por medio de la regulación de la proteína estructural codificada por el gen L5 la cual se expresa en fase tardía del ciclo de replicación viral. Para lograr esto añadieron una región 3'UTR que contiene 8 sitios de unión a miR-148a. Se colocó corriente abajo de la secuencia codificante de L5 (Ad-L5-8miR148aT). Dado que el miR148a presenta niveles de expresión mucho mayor en tejidos normales que en tumorales, se espera que el adenovirus no se replique en tejido normal por no poder ensamblarse completamente debida a la falta de expresión de la proteína estructural codificada por L5. Se observó en el modelo xenograft murino (línea celular RWP1: adenocarcinoma de páncreas humano), que la producción de partículas virales en hígado estaba disminuidas drásticamente, pero la actividad oncolítica se encontró conservada con respecto al grupo control tratado con Ad no modificado (119).

Mao y colaboradores utilizaron un adenovirus modificado (ad ZD55: delección del gen E1B) y nuevamente rediseñaron el virus al insertar un shRNA dirigido contra SBT1 (factor de transcripción y remodelador de la cromatina; el cual ha sido blanco de tratamiento en cáncer de próstata), obteniendo ZD55-SATB1. Se evaluaron efectos in vitro e in vivo. Estudios in vivo se realizaron en un modelo de cáncer de próstata xenograft de ratón; se observó inhibición en el crecimiento tumoral y aumento de la actividad apoptótica en el tumor en el grupo tratado con ZD55-SATB1 comparado a grupos control tratados con PBS y ZD55 (120).

Otro estudio utilizó un sistema en el cual se buscaba disminuir el tropismo del virus oncolítico measles por órganos como el cerebro, tracto gastrointestinal e hígado. Dicho sistema consistía en la inserción de sitios blanco de microRNA sintético (miRTS) en el genoma del Measles virus; por lo cual ante la presencia de los miRNAs (presentes en mayor cantidad en los órganos anteriormente mencionados con respecto al tejido tumoral) que presentaran afinidad por el miRTS, el virus no se replicaría. Estos miRNAs son miR-7, miR-122 y miR148a. El Measles virus modificado: multi-tissue-detargeted MV (MV-EGFP<sup>mtd</sup>) En modelo murino xenograft de cáncer de páncreas (células BxPC-3  $6 \times 10^6$  implantadas subcutáneamente en flanco derecho) se observó que el volumen tumoral se redujo y se mantuvo constante a lo largo del tiempo, al igual que la infectividad del virus en el tumor tanto en el grupo tratado con MV-EGFP<sup>mtd</sup> (se aplicaron 5 dosis de  $1 \times 10^7$

unidades infecciosas a los 10 días de la implantación tumoral) como en el tratado con el MV sin modificación (se aplicaron 5 dosis de  $1 \times 10^7$  unidades infecciosas a los 10 días de la implantación tumoral) (121).

## 8. DISCUSIÓN

Los virus oncolíticos suelen presentar un tropismo por las células tumorales y no por las células normales, sin embargo por las barreras biológicas propias del huésped es necesario el empleo de métodos que faciliten su llegada al tejido tumoral. El método en el cual se usan células transportadoras favorece la protección de los virus ante los diferentes tipos de respuesta inmune; sin embargo la eficacia del transporte del virus al tejido tumoral depende del tipo de célula que se utilice para dicho transporte y su afinidad por el tejido tumoral. Debe tenerse en cuenta el tropismo de la célula transportadora por el tumor en los casos de administración intravenosa sistémica, pues según esto se haría necesario implementar modificaciones genéticas en las células transportadoras para aumentar su afinidad lo que puede implicar una mayor inversión de recursos técnicos.

El método de empleo de polímeros o liposomas de encapsulamiento también tiene la ventaja de proteger a los virus contra la respuesta inmune sin embargo al ser membranas de recubrimiento no presentan tropismo, lo cual es un inconveniente en el caso de buscar un tratamiento sistémico y no intratumoral. Por lo anteriormente dicho estos polímeros o membranas también requieren modificaciones físicas o químicas en su superficie para añadir proteínas ya sea tipo receptor, ligando, anticuerpo, etc.

La terapia fotodinámica es un tratamiento prometedor que lleva poco tiempo de usarse en combinación con virus oncolíticos, sin embargo se ha visto que potencia la oncolisis al utilizarse junto a virus oncolíticos. El inconveniente que presenta es que al ser necesaria la fotoestimulación directa no se puede realizar en tumores sólidos que se encuentren en órganos internos, o metástasis; por lo que por ahora su mayor futuro terapéutico es en tratamientos de cáncer de piel.

La técnica de ultrasonido es muy prometedora pues es mínimamente invasiva y las ondas de ultrasonido no parecen producir efectos adversos en el huésped. Es una forma de inducir un desplazamiento dirigido (en este caso de las microburbujas) hacia

determinados órganos o tejidos, sin embargo esta inducción requiere de contacto cercano con el transductor y la dirección de desplazamiento no se puede elegir a libertad, por lo que sería óptimo en tratamientos intratumor (inyecciones intratumorales), mas no en tratamientos sistémicos intravenosos; ya que al no poder dirigir las microburbujas a larga distancia no se puede garantizar que el destino de estas sea el correcto. Esto lo puede convertir en un método operador-dependiente.

Aunque el empleo de miRNAs en tratamiento y diagnóstico del cáncer no es nuevo, si lo es su empleo junto a virus oncolíticos; esta herramienta busca no solo potenciar la actividad oncolítica viral sino la especificidad por las células tumorales. La ventaja que presenta es que al combinarse con virus oncolíticos se están realizando dos tratamientos en uno pues se están usando dos vías distintas de tratamiento: **1.** La vía de los miRNAs que consiste en inhibir la transcripción de genes específicos (según el tipo de microRNA utilizado) que conducen a estrés celular lo que al final lleva a inducción de señales proapopticas de la célula tumoral. **2.** La vía o vías de los virus oncolíticos, siendo una de ellas la lisis tumoral directa. La desventaja de esta técnica es que la expresión de microRNAs puede no estar totalmente abolida en el tumor; ejemplo: los tumores suelen presentar bajos niveles de expresión de ciertos tipos de miRNAs con respecto a tejidos normales, pero esto no quiere decir que los tejidos tumorales no los expresen; por lo que al usar microRNAs que controlan la replicación viral , puede disminuir leve o moderadamente la replicación viral en tumores [pues aunque la expresión de microRNAs sea menor al tejido normal, podrían producir cierta cantidad basalmente, los cuales podrían interactuar con las zonas 3'UTR modificadas en el virus, e inhibir la expresión del gen que está regulando esta región 3'UTR (un gen encargado de la replicación viral)].

La ingeniería genética es la metodología más usada, y se puede decir que su empleo es casi imprescindible en el tratamiento antitumoral con virus oncolíticos; es necesaria para aumentar la especificidad, actividad oncolítica, aumento de la sobrevivencia del virus, entre otras. Su desventaja es que al ser un método que requiere el uso de más recursos técnicos, tratamientos que empleen el uso de ingeniería genética, verán reflejado un aumento en el costo económico de estos, al emplearse en pacientes.

Se ha visto que el uso de coadyuvantes al aplicar los virus oncolíticos es una opción segura, y depende más del tipo de coadyuvante que se use. Es una buena opción para mejorar la efectividad de los virus oncolíticos.

De los métodos mencionados anteriormente, la mayoría son aplicables en el modelo empleado con rotavirus en el laboratorio de Biología molecular de virus; el uso de células transportadoras es un método eficaz al proteger al rotavirus de la respuesta inmune del huésped. Se requiere determinar el tipo de célula transportadora a usar según el modelo tumoral estudiado.

El empleo de encapsulamiento de rotavirus también es factible al emplearlo en modelos in vivo, sin embargo al requerir modificaciones físicas o químicas para aumentar la afinidad por el tejido tumoral, lo vuelven menos costo eficiente que el empleo de células transportadoras.

El uso de ultrasonido requeriría no solo la adquisición de las microburbujas sino también del transductor, además que se requiere de un adecuado direccionamiento de las microburbujas hacia el tejido tumoral, lo cual requiere de entrenamiento en el manejo del equipo.

El empleo de terapia fotodinámica es una metodología aplicable en el laboratorio de biología molecular de virus, pues al utilizar modelos in vivo de ratones con implantes de tumores subdérmicos, se facilita la exposición al rayo de luz con longitud de onda específico para estimular el fotosensibilizador que se utilice.

Utilizar la metodología de miRNAs también es viable con el modelo de rotavirus utilizado en el laboratorio, sin embargo sería necesario determinar el perfil de expresión de miRNAs de los tumores a estudiar. Por otra parte sería necesario manipular genéticamente al rotavirus para que expresara determinados miRNAs.

El uso de ingeniería genética es factible, pero es poco costoeficiente con respecto a métodos como el de células transportadoras e incluso la terapia fotodinámica, ya que se tendrían que realizar varias modificaciones genéticas al rotavirus para aumentar su afinidad por el tumor, y estas modificaciones dependerían del tipo de tumor que se esté estudiando.

Los coadyuvantes son una buena opción para mejorar la eficacia del rotavirus como terapia oncolítica en modelos in vivo, pues según el coadyuvante usado se puede facilitar la entrada del rotavirus al tumor y facilitar también su eliminación.

Con respecto a la terapia oncolítica el desafío más importante que presenta es el de mejorar su eficacia de eliminar el tumor, pues las barreras existentes del huésped disminuyen la biodisponibilidad del virus oncolítico y su viabilidad, por lo que los métodos actuales se enfocan en aumentar dicha eficacia oncolítica.

Las perspectivas de la terapia oncolítica son que su uso en pacientes se utilice cada vez más, que la terapia oncolítica se emplee como primera línea de tratamiento y no solo como terapia adyuvante, y que junto a la inmunoterapia en un futuro reemplacen a la quimioterapia y cirugía oncológica actual.

## **9. CONCLUSIONES**

- 1.** Los sistemas de transporte son eficaces para evitar la respuesta inmune del huésped contra el virus.
- 2.** La ingeniería genética es la técnica más usada en estudios con virus oncolíticos.
- 3.** La combinación de varias metodologías es lo que ha mostrado mayor respuesta terapéutica con virus oncolíticos.
- 4.** Es necesario evaluar costo-efectividad en el empleo de diferentes métodos de tratamientos con virus oncolíticos.

# A. ANEXO: RESULTADOS DE BÚSQUEDA EN BASES DE DATOS

## Application oncolytic virus

The screenshot shows the PubMed search interface. The search query is "Application oncolytic virus[Title/Abstract]". The results are displayed on page 1 of 3, with 1 to 20 of 57 items shown. The search results section includes a list of titles with search terms, such as "Pediatric cancer gene viral. Part II: potential clinic [Mol Ther Oncolytics. 2015]" and "Pulsed versus continuous application of". The interface also includes navigation options like "First", "Prev", "Next", and "Last".

## Oncolytic immunotherapy

The screenshot shows the PubMed search interface. The search query is "oncolytic immunotherapy[Title/abstract]". The results are displayed on page 1 of 2, with 1 to 20 of 39 items shown. The search results section includes a list of titles with search terms, such as "Correction: Bortezomib Treatment Sensitizes Oncol [Clin Cancer Res. 2017]". The interface also includes navigation options like "First", "Prev", "Next", and "Last".

# Oncolytic virus

The screenshot shows the PubMed search interface. At the top, the search bar contains 'oncolytic virus[Title]' and the search button is labeled 'Search'. Below the search bar, there are options for 'Format: Summary', 'Sort by: Most Recent', and 'Per page: 20'. The search results section displays 'Items: 1 to 20 of 211'. A snippet of a result is visible: 'Clinical Trials with Oncolytic Measles Virus. C [Curr Cancer Drug Targets. 2017]'. Below the PubMed interface, there is an EBSCOhost search bar with the query 'Oncolytic virus' and a 'Buscar' button. The EBSCOhost interface also shows 'Resultados de la búsqueda: 1 a 10 de 1,603'.

# Therapy oncolytic virus

The screenshot shows the PubMed search interface. At the top, the search bar contains 'Therapy oncolytic virus[Title]' and the search button is labeled 'Search'. Below the search bar, there are options for 'Format: Summary', 'Sort by: Most Recent', and 'Per page: 20'. The search results section displays 'Items: 1 to 20 of 191'. A snippet of a result is visible: 'Systemic therapy with oncolytic myxoma virus [Mol Ther Oncolytics. 2016]'. Below the PubMed interface, there is an EBSCOhost search bar with the query 'Therapy oncolytic virus' and a 'Buscar' button. The EBSCOhost interface also shows 'Resultados de la búsqueda: 1 a 10 de 110'. At the bottom of the EBSCOhost interface, there is a MyJSTOR logo and navigation links for 'Home', 'Search', 'Browse', and 'MyJSTOR'.



# Viral oncotherapy

The screenshot shows the PubMed search interface. The search term 'viral oncotherapy' is entered in the search bar. The results page displays 'Search results' with 'Items: 1 to 20 of 21'. The interface includes navigation links like 'Nueva búsqueda', 'Materias', 'Publicaciones', and 'Imágenes'. A secondary search bar from EBSCOhost is also visible, showing the same search term. The MyJSTOR logo is present at the bottom of the search results section.

# Viral vector cancer therapy

The screenshot shows the PubMed search interface with the search term 'Viral vector cancer therapy[Title]'. The results page displays 'Search results' with 'Items: 1 to 20 of 81'. The interface includes navigation links like 'Nueva búsqueda', 'Materias', 'Publicaciones', and 'Imágenes'. A secondary search bar from EBSCOhost is also visible, showing the search term 'viral vector cancer therapy'. The MyJSTOR logo is present at the bottom of the search results section.

# Virus tumour targeting

The screenshot displays a search engine interface with the following components:

- Top Bar:** Includes the NCBI logo, "Resources" and "How To" links, and a "Sign in to NCBI" button.
- Search Bar:** Contains the text "virus tumour targeting[Title/abstract]" and a "Search" button. Below the bar are links for "Create RSS", "Create alert", and "Advanced".
- Filters:** On the left, there are options for "Article types" (Clinical Trial, Review, Customize...), "Text availability", "Format: Summary", "Sort by: Most Recent", and "Per page: 20". On the right, there is a "Send to" dropdown and a "Filters: Manage Filters" link.
- Search Results:** Shows "Search results" with "Items: 1 to 20 of 25". A navigation bar includes "First", "Prev", "Page 1 of 2", "Next", and "Last". A snippet of a result is visible: "Titles with your search terms: Novel tumour-specific promoters for transcriptional target [J Gene Med. 2010]".
- Navigation Bar:** Features "Nueva búsqueda", "Materias", "Publicaciones", "Imágenes", "Más", "Conectar", "Carpeta", "Preferencias", "Idiomas", "Ayuda", and "Salir".
- EBSCOhost Section:** Includes the EBSCOhost logo, a search bar with "virus tumour targeting", a "Buscar" button, and a "UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA" affiliation.
- Refinement Bar:** Contains "Depurar los resultados", "Relevancia", "Opciones de página", and "Compartir".
- MyJSTOR Section:** Features the MyJSTOR logo, navigation links (Home, Search, Browse, MyJSTOR), and utility links (Help, Contact Us, About, Login).
- Search Results Summary:** Displays "386 Search Results" and a search bar containing "(virus tumour targeting)".
- Filter Results:** Shows "Filter Results" and "Showing 1-25 of 386".

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Bray F. The evolving scale and profile of cancer worldwide: Much ado about everything. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2016;25(1):3–5.
2. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-tieulent J, Jemal A. Global Cancer Statistics, 2012. *CA a cancer J Clin.* 2015;65(2):87–108.
3. <https://www.cancer.gov/news-events/cancer-currents-blog/2015/t-vec-melanoma>
4. Kaufman HL, Kohlhapp FJ, Zloza A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2015;14(9):642–62.
5. Nguyen A, Ho L, Wan Y. Chemotherapy and Oncolytic Virotherapy: Advanced Tactics in the War against Cancer. *Front Oncol.* 2014;4(June):145.
6. Aurelian L. Oncolytic viruses as immunotherapy: Progress and remaining challenges. *Onco Targets Ther.* 2016;9:2627–37.
7. Zeyaulah M, Patro M, Ahmad I, Ibraheem K, Sultan P, Nehal M, et al. Oncolytic viruses in the treatment of cancer: a review of current strategies. *Pathol Oncol Res.* 2012;18(4):771–81.
8. Ries SJ, Brandts CH. Oncolytic viruses for the treatment of cancer: Current strategies and clinical trials. *Drug Discov Today.* 2004;9(17):759–68.
9. Coffin RS. From virotherapy to oncolytic immunotherapy: Where are we now? *Curr Opin Virol.* 2015;13:93–100.
10. Melcher A, Parato K, Rooney CM, Bell JC. Thunder and Lightning: Immunotherapy and Oncolytic Viruses Collide. *Mol Ther.* 2011;19(6):1008–16.
11. Cassady KA, Haworth KB, Jackson J, Markert JM, Cripe TP. To infection and beyond: The multi-pronged anti-cancer mechanisms of oncolytic viruses. *Viruses.* 2016;8(2):1–9.
12. Singh PK, Doley J, Kumar GR, Sahoo AP, Tiwari AK. Oncolytic viruses & their specific targeting to tumour cells. *Indian J Med Res.* 2012;136(4):571–84.

13. Ruf B, Lauer UM. Assessment of current virotherapeutic application schemes: “hit hard and early” versus “killing softly”? *Mol Ther — Oncolytics*. 2015;2(July):15018.
14. Patel MR, Kratzke RA. Oncolytic virus therapy for cancer: The first wave of translational clinical trials. *Transl Res*. 2013;161(4):355–64.
15. Buijs PRA, Verhagen JHE, van Eijck CHJ, van den Hoogen BG. Oncolytic viruses: From bench to bedside with a focus on safety. *Hum Vaccines Immunother*. 2015;11(7):1573–84.
16. Goldufsky J. Oncolytic virus therapy for cancer. *Oncolytic virotherapy*. 2013;2(9):31–46.
17. Sze DY, Reid TR, Rose SC. Oncolytic virotherapy. *J Vasc Interv Radiol*. 2013;24(8):1115–22.
18. Taguchi S, Fukuhara H, Homma Y, Todo T. Current status of clinical trials assessing oncolytic virus therapy for urological cancers. *Int J Urol*. 2017;24(5):342–51.
19. Turnbull S, West EJ, Scott KJ, Appleton E, Melcher A, Ralph C. Evidence for oncolytic virotherapy: Where have we got to and where are we going? *Viruses*. 2015;7(12):6291–312.
20. Fukuhara H, Ino Y, Todo T. Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn. *Cancer Sci*. 2016;107(10):1373–9.
21. Lukashev AN, Zamyatnin AA. Viral vectors for gene therapy: Current state and clinical perspectives. *Biochem*. 2016;81(7):700–8.
22. Bell J, McFadden G. Viruses for tumor therapy. *Cell Host Microbe*. 2014;15(3):260–5.
23. Kim KH, Dmitriev IP, Saddekni S, Kashentseva EA, Harris RD, Aurigemma R, et al. A phase I clinical trial of Ad5/3-Δ24, a novel serotype-chimeric, infectivity-enhanced, conditionally-replicative adenovirus (CRAd), in patients with recurrent ovarian cancer. *Vol. 130, Gynecologic Oncology*. 2013. p. 518–24.
24. Russell WC. Update on adenovirus and its vectors General properties of adenoviruses. *J Gen Virol*. 2007;2(2000):1–48.

25. Shirakawa T. The current status of adenovirus-based cancer gene therapy. *Mol Cells*. 2008;25(4):462–6.
26. Peng K-W, Teneyck CJ, Galanis E, Kalli KR, Hartmann LC, Russell SJ. Intraperitoneal Therapy of Ovarian Cancer Using an Engineered Measles Virus. *Cancer Res*. 2002;62:4656–62.
27. Msaouel P, et Al. Clinical testing of oncolytic measles virus strains in the treatment of cancer. *Curr Opin Mol Ther*. 2009;11(1):43–53.
28. Ganar K, Das M, Sinha S, Kumar S. Newcastle disease virus: Current status and our understanding. *Virus Res*. 2014;184:71–81.
29. Nüesch JPF, Lacroix J, Marchini A, Rommelaere J. Molecular pathways: Rodent parvoviruses - Mechanisms of oncolysis and prospects for clinical cancer treatment. *Clin Cancer Res*. 2012;18(13):3516–23.
30. Angelova AL, Geletneky K, Nuesch JP, Rommelaere J. Tumor Selectivity of Oncolytic Parvoviruses: From in vitro and Animal Models to Cancer Patients. *Front Bioeng Biotechnol*. 2015;3(April):55.
31. Marchini A, Bonifati S, Scott EM, Angelova AL, Rommelaere J. Oncolytic parvoviruses: from basic virology to clinical applications. *Viol J*. 2015;12(1):6.
32. Brown MC, Dobrikova EY, Dobrikov MI, Walton RW, Gemberling SL, Nair SK, et al. Oncolytic polio virotherapy of cancer. *Cancer*. 2014;120(21):3277–86.
33. Mohamed A, Johnston RN, Shmulevitz M. Potential for improving potency and specificity of reovirus oncolysis with next-generation reovirus variants. *Viruses*. 2015;7(12):6251–78.
34. Clements D, Helson E, Gujar S, Lee P. Reovirus in cancer therapy: an evidence-based review. *Oncolytic Virotherapy*. 2014;3:69–82.
35. Badrinath N, Heo J, Yoo SY. Viruses as nanomedicine for cancer. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:4835–47.
36. Liem J, Liu J. Stress Beyond Translation : Poxviruses and More. 2016;1–20.

37. Heiber JF, Xu XX, Barber GN. Review Current State of Ovarian Cancer Treatment A Brief History of Oncolytic Virus. :805–14.
38. Willmon C, Harrington K, Kottke T, Prestwich R, Melcher A, Vile R. Cell carriers for oncolytic viruses: Fed Ex for cancer therapy. *Mol Ther.* 2009;17(10):1667–76.
39. Tong Y, Qian W. Targeting cancer stem cells with oncolytic virus. 2014;(17):1–7.
40. Raykov Z, Rommelaere J. Potential of tumour cells for delivering oncolytic viruses. *Gene Ther.* 2008;15:704–10.
41. Ahmed AU, Tyler MA, Thaci B, Alexiades NG, Han Y, Ulasov I V. A Comparative Study of Neural and Mesenchymal Stem Cell- Based Carriers for Oncolytic Adenovirus in a Model of Malignant Glioma. *Mol Pharm.* 2012;8(5):1559–72.
42. Kim Y, Clements DR, Sterea AM, Jang HW, Gujar SA, Lee PWK. Dendritic cells in oncolytic virus-based anti-cancer therapy. *Viruses.* 2015;7(12):6506–25.
43. Jakeman PG, Hills TE, Fisher KD, Seymour LW. Macrophages and their interactions with oncolytic viruses. *Curr Opin Pharmacol.* 2015;24:23–9.
44. Muthana M, Rodrigues S, Chen YY, Welford A, Hughes R, Tazzyman S, et al. Macrophage delivery of an oncolytic virus abolishes tumor regrowth and metastasis after chemotherapy or irradiation. *Cancer Res.* 2013;73(2):490–5.
45. Muthana M, Giannoudis A, Scott SD, Fang HY, Coffelt SB, Morrow FJ, et al. Use of macrophages to target therapeutic adenovirus to human prostate tumors. *Cancer Res.* 2011;71(5):1805–15.
46. Ahmed AU, Thaci B, Alexiades NG, Han Y, Qian S, Liu F, et al. Neural Stem Cell-based Cell Carriers Enhance Therapeutic Efficacy of an Oncolytic Adenovirus in an Orthotopic Mouse Model of Human Glioblastoma. *Mol Ther.* 2011;19(9):1714–26.
47. Ong HT, Federspiel MJ, Guo CM, Ooi LL, Russell SJ, Peng KW, et al. Systemically delivered measles virus-infected mesenchymal stem cells can evade host immunity to inhibit liver cancer growth. *J Hepatol.* 2013;59(5):999–1006.

48. Fujiwara S, Nawa A, Luo C, Kamakura M, Goshima F, Kondo C, et al. Carrier cell-based delivery of replication-competent HSV-1 mutants enhances antitumor effect for ovarian cancer. *Cancer Gene Ther.* 2011;18(2):77–86.
49. Coukos G, Makrigiannakis A, Kang EH, Caparelli D, Benjamin I, Kaiser LR, et al. Use of carrier cells to deliver a replication-selective herpes simplex virus-1 mutant for the intraperitoneal therapy of epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 1999;5(6):1523–37.
50. Raykov Z, Balboni G, Aprahamian M, Rommelaere J. Carrier cell-mediated delivery of oncolytic parvoviruses for targeting metastases. *Int J Cancer.* 2004;109(5):742–9.
51. Adair R a, Roulstone V, Scott KJ, Morgan R, Nuovo GJ, Fuller M, et al. Cell carriage, delivery, and selective replication of an oncolytic Virus in Tumor in Patients. 2014;4(138).
52. Power AT, Wang J, Falls TJ, Paterson JM, Parato KA, Lichty BD, et al. Carrier cell-based delivery of an oncolytic virus circumvents antiviral immunity. *Mol Ther.* 2007;15(1):123–30.
53. Martinez-Quintanilla J, He D, Wakimoto H, Alemany R, Shah K. Encapsulated Stem Cells Loaded With Hyaluronidase-expressing Oncolytic Virus for Brain Tumor Therapy. *Mol Ther.* 2014;23(1):1–11.
54. Choi J-W, Lee YS, Yun C-O, Kim SW. Polymeric oncolytic adenovirus for cancer gene therapy. *J Control Release.* 2015;219:181–91.
55. Bachtarzi H, Stevenson M, Šubr V, Ulbrich K, Seymour LW, Fisher KD. Targeting adenovirus gene delivery to activated tumour-associated vasculature via endothelial selectins. *J Control Release.* 2011;150(2):196–203.
56. Kaneda Y. Virosome: A novel vector to enable multi-modal strategies for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(8):730–8.
57. Bian H, Wilden H, Fournier P, Peeters B, Schirrmacher V. In vivo efficacy of systemic tumor targeting of a viral RNA vector with oncolytic properties using a bispecific adapter protein. *Int J Oncol.* 2006;29(6):1359–69.

58. Conner J, Braidwood L, Brown SM. A strategy for systemic delivery of the oncolytic herpes virus HSV1716: redirected tropism by antibody-binding sites incorporated on the virion surface as a glycoprotein D fusion protein. *Gene Ther.* 2008;15(24):1579–92.
59. Grünwald GK, Vetter A, Klutz K, Willhauck MJ, Schwenk N, Senekowitsch-Schmidtke R, et al. EGFR-Targeted Adenovirus Dendrimer Coating for Improved Systemic Delivery of the Theranostic NIS Gene. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2013;2(11):e131.
60. Choi J-W, Dayananda K, Jung S-J, Lee S-H, Kim D, Hu J, et al. Enhanced anti-tumor efficacy and safety profile of tumor microenvironment-responsive oncolytic adenovirus nanocomplex by systemic administration. *Acta Biomater.* 2015;28:86–98.
61. Vasiljevic S, Beale E V., Bonomelli C, Easthope IS, Pritchard LK, Seabright GE, et al. Redirecting adenoviruses to tumour cells using therapeutic antibodies: Generation of a versatile human bispecific adaptor. *Mol Immunol.* 2015;68(2):234–43.
62. Muharemagic D, Zamay A, Ghobadloo SM, Evgin L, Savitskaya A, Bell JC, et al. Aptamer-facilitated Protection of Oncolytic Virus from Neutralizing Antibodies. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2014;3(April):e167.
63. Yang L, Wang L, Su X, Wang L, Chen X, Li D, et al. Suppression of ovarian cancer growth via systemic administration with liposome-encapsulated adenovirus-encoding endostatin. *Cancer Gene Ther.* 2010;17(1):49–57.
64. Morrison J, Briggs SS, Green N, Fisher K, Subr V, Ulbrich K, et al. Virotherapy of ovarian cancer with polymer-cloaked adenovirus retargeted to the epidermal growth factor receptor. *Mol Ther.* 2008;16(2):244–51.
65. Kim J, Li Y, Kim SW, Lee DS, Yun CO. Therapeutic efficacy of a systemically delivered oncolytic adenovirus - Biodegradable polymer complex. *Biomaterials.* 2013;34(19):4622–31.
66. Collection S. HHS Public Access. 2016;8(5):583–92.



67. Garofalo M, Iovine B, Kuryk L, Capasso C, Hirvonen M, Vitale A, et al. Oncolytic adenovirus loaded with L-carnosine as novel strategy to enhance the antitumor activity. *Mol Cancer Ther.* 2016;15(4).
68. Ran L, Tan X, Li Y, Zhang H, Ma R, Ji T, et al. Delivery of oncolytic adenovirus into the nucleus of tumorigenic cells by tumor microparticles for virotherapy. *Biomaterials.* 2016;89:56–66.
69. Nosaki K, Hamada K, Takashima Y, Sagara M, Matsumura Y, Miyamoto S, et al. A novel, polymer-coated oncolytic measles virus overcomes immune suppression and induces robust antitumor activity. *Mol Ther - Oncolytics.* 2016;3(February):16022.
70. Bazan-Peregrino M, Arvanitis CD, Rifai B, Seymour LW, Coussios CC. Ultrasound-induced cavitation enhances the delivery and therapeutic efficacy of an oncolytic virus in an in vitro model. *J Control Release.* 2012;157(2):235–42.
71. Nande R, Howard CM, Claudio PP. Oncolytic Virotherapy Dovepress Ultrasound-mediated oncolytic virus delivery and uptake for increased therapeutic efficacy: state of art. *Oncolytic Virotherapy.* 2015;4:193–205.
72. Okunaga S, Takasu A, Meshii N, Imai T, Hamada M, Iwai S, et al. Entry of oncolytic herpes simplex virus into human squamous cell carcinoma cells by ultrasound. *Viruses.* 2015;7(10):5610–8.
73. Okunaga S, Takasu A, Meshii N, Imai T, Hamada M, Iwai S, et al. Ultrasound as a method to enhance antitumor ability of oncolytic herpes simplex virus for head and neck cancer. *Cancer Gene Ther.* 2015;22(3):163–8.
74. Myers R, Coviello C, Erbs P, Foloppe J, Rowe C, Kwan J, et al. Polymeric Cups for Cavitation-mediated Delivery of Oncolytic Vaccinia Virus. *Mol Ther.* 2016;24(9):1627–33.
75. Rommelfanger DM, Grau MC, Diaz RM, Ilett E, Alvarez-Vallina L, Thompson JM, et al. The Efficacy Versus Toxicity Profile of Combination Virotherapy and TLR Immunotherapy Highlights the Danger of Administering TLR Agonists to Oncolytic Virus-treated Mice. *Mol Ther.* 2012;21(2):348–57.

76. Kottke T, Galivo F, Wongthida P, Diaz RM, Thompson J, Jevremovic D, et al. Treg depletion-enhanced IL-2 treatment facilitates therapy of established tumors using systemically delivered oncolytic virus. *Mol Ther*. 2008;16(7):1217–26.
77. Currier MA, Mahller YY, Stroup G, Kambara H, Chiocca EA, Cripe TP. 657. Combination Therapy with Cyclophosphamide and the Oncolytic Herpes Virus Mutant rRp450, Expressing a Cyclophosphamide Prodrug. *Mol Ther*. 2006;13:S253.
78. Currier MA, Mahller YY, Stroup G, Kambara H, Chiocca EA, Cripe TP. 657. Combination Therapy with Cyclophosphamide and the Oncolytic Herpes Virus Mutant rRp450, Expressing a Cyclophosphamide Prodrug, Is Clinically Safe by Intratumoral, Intravenous, and Intracerebral Administration in an HSV-1 Susceptible Mouse Model. *Mol Ther*. 2006;13:S253.
79. Ashshi AM, El-Shemi AG, Dmitriev IP, Kashentseva EA, Curiel DT. Combinatorial strategies based on CRAd-IL24 and CRAd-ING4 virotherapy with anti-angiogenesis treatment for ovarian cancer. *J Ovarian Res*. 2016;9(1):38.
80. Bridle BW, Stephenson KB, Boudreau JE, Koshy S, Kazdhan N, Pullenayegum E, et al. Potentiating Cancer Immunotherapy Using an Oncolytic Virus. *Mol Ther*. 2010;18(8):1430–9.
81. Liu Y-P, Tong C, Dispenzieri A, Federspiel MJ, Russell SJ, Peng K-W. Polyinosinic acid decreases sequestration and improves systemic therapy of measles virus. *Cancer Gene Ther*. 2012;19(3):202–11.
82. Lemay CG, Rintoul JL, Kus A, Paterson JM, Garcia V, Falls TJ, et al. Harnessing oncolytic virus-mediated antitumor immunity in an infected cell vaccine. *Mol Ther*. 2012;20(9):1791–9.
83. Ilett E, Kottke T, Donnelly O, Thompson J, Willmon C, Diaz R, et al. Cytokine conditioning enhances systemic delivery and therapy of an oncolytic virus. *Mol Ther*. 2014;22(10):1851–63.
84. Qiao J, Kottke T, Willmon C, Galivo F, Wongthida P, Diaz RM, et al. Purging metastases in lymphoid organs using a combination of antigen-nonspecific adoptive T cell therapy, oncolytic virotherapy and immunotherapy. *Nat Med*. 2008;14(1):37–44.

85. Gujar SA, Clements D, Dielschneider R, Helson E, Marcato P, Lee PWK. Gemcitabine enhances the efficacy of reovirus-based oncotherapy through anti-tumour immunological mechanisms. *Br J Cancer*. 2014;110(1):83–93.
86. Kurozumi K, Hardcastle J, Thakur R, Yang M, Christoforidis G, Fulci G, et al. Effect of tumor microenvironment modulation on the efficacy of oncolytic virus therapy. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99(23):1768–81.
87. Francis L, Guo ZS, Liu Z, Ravindranathan R, Urban JA, Sathaiah M, et al. Modulation of chemokines in the tumor microenvironment enhances oncolytic virotherapy for colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016;7(16):22174–85.
88. Diop-Frimpong B, Chauhan VP, Krane S, Boucher Y, Jain RK. Losartan inhibits collagen I synthesis and improves the distribution and efficacy of nanotherapeutics in tumors. *Pnas*. 2011;108(7):2909–14.
89. Engeland CE, Grossardt C, Veinalde R, Bossow S, Lutz D, Kaufmann JK, et al. CTLA-4 and PD-L1 checkpoint blockade enhances oncolytic measles virus therapy. *Mol Ther*. 2014;22(11):1949–59.
90. Pencavel TD, Wilkinson MJ, Mansfield DC, Khan AA, Seth R, Karapanagiotou EM, et al. Isolated limb perfusion with melphalan, tumour necrosis factor-Alpha and oncolytic vaccinia virus improves tumour targeting and prolongs survival in a rat model of advanced extremity sarcoma. *Int J Cancer*. 2015;136(4):965–76.
91. Dobson CC, Naing T, Beug ST, Faye MD, Chabot J, St-Jean M, et al. Oncolytic virus synergizes with Smac mimetic compounds to induce rhabdomyosarcoma cell death in a syngeneic murine model. *Oncotarget*. 2017;8(2):3495–508.
92. Vandenberg L, Belmans J, Van Woensel M, Riva M, Van Gool SW. Exploiting the immunogenic potential of cancer cells for improved dendritic cell vaccines. *Front Immunol*. 2016;6(JAN):1–15.
93. Al-shammari AM, Lech PJ, Russell SJ. 171. Photosensitizing Oncolytic Measles Virus for Cancer Viro-Photodynamic Therapy. *Mol Ther*. 2014;22:S65.

94. Gil M, Bieniasz M, Seshadri M, Fisher D, Ciesielski MJ, Chen Y, et al. Photodynamic therapy augments the efficacy of oncolytic vaccinia virus against primary and metastatic tumours in mice. *Br J Cancer*. 2011;105(10):1512–21.
95. Takehara K, Tazawa H, Okada N, Hashimoto Y, Kikuchi S, Kuroda S, et al. Targeted Photodynamic Virotherapy Armed with a Genetically Encoded Photosensitizer. *Mol Cancer Ther*. 2016;15(1):199–208.
96. Biederer C, Ries S, Brandts CH, McCormick F. Replication-selective viruses for cancer therapy. *J Mol Med*. 2002;80(3):163–75.
97. Pourchet A, Fuhrmann SR, Pilonis KA, Demaria S, Frey AB, Mulvey M, et al. CD8+ T-cell Immune Evasion Enables Oncolytic Virus Immunotherapy. *EBioMedicine*. 2016;5:59–67.
98. Fu X, Rivera A, Tao L, Zhang X. An HSV-2 based oncolytic virus can function as an attractant to guide migration of adoptively transferred T cells to tumor sites. *Oncotarget*. 2015;6(2):902–14.
99. Kuo SP, Bradley LA, Trussell LO. NIH Public Access. *Hear Res*. 2010;29(30):9625–34.
100. Cronin M, Le Boeuf F, Murphy C, Roy DG, Falls T, Bell JC, et al. Bacterial-mediated knockdown of tumor resistance to an oncolytic virus enhances therapy. *Mol Ther*. 2014;22(6):1188–97.
101. Zheng F, Xu Y, Yang R, Wu B, Tan X, Qin Y, et al. Combination effect of oncolytic adenovirus therapy and herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir in hepatic carcinoma animal models. *Acta Pharmacol Sin*. 2009;30(5):617–27.
102. Komorowski MP, McGray AJR, Kolakowska A, Eng K, Gil M, Opyrchal M, et al. Reprogramming antitumor immunity against chemoresistant ovarian cancer by a CXCR4 antagonist-armed viral oncotherapy. *Mol Ther Oncolytics*. 2016;3(November):16034.
103. Cockle J V., Rajani K, Zaidi S, Kottke T, Thompson J, Diaz RM, et al. Combination viroimmunotherapy with checkpoint inhibition to treat glioma, based on location-specific tumor profiling. *Neuro Oncol*. 2016;18(4):518–27.

104. Gil M, Seshadri M, Komorowski MP, Abrams SI, Kozbor D. Targeting CXCL12/CXCR4 signaling with oncolytic virotherapy disrupts tumor vasculature and inhibits breast cancer metastases. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110(14):E1291–300.
105. Wang Z, Yu B, Wang B, Yan J, Feng X, Wang Z, et al. A novel capsid-modified oncolytic recombinant adenovirus type 5 for tumor-targeting gene therapy by intravenous route. *Oncotarget*. 2016;7(30).
106. Grossardt C, Engeland CE, Bossow S, Halama N, Zaoui K, Leber MF, et al. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor-Armed Oncolytic Measles Virus Is an Effective Therapeutic Cancer Vaccine. *Hum Gene Ther*. 2013;24(7):644–54.
107. Menotti L, Nicoletti G, Gatta V, Croci S, Landuzzi L, De Giovanni C, et al. Inhibition of human tumor growth in mice by an oncolytic herpes simplex virus designed to target solely HER-2-positive cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(22):9039–44.
108. Muik A, Stubbert LJ, Jahedi RZ, Geib Y, Kimpel J, Dold C, et al. Re-engineering vesicular stomatitis virus to abrogate neurotoxicity, circumvent humoral immunity, and enhance oncolytic potency. *Cancer Res*. 2014;74(13):3567–78.
109. Bai F-L, Yu Y-H, Tian H, Ren G-P, Wang H, Zhou B, et al. Genetically engineered Newcastle disease virus expressing interleukin-2 and TNF-related apoptosis-inducing ligand for cancer therapy. *Cancer Biol Ther*. 2014;15(9):1226–38.
110. Vigil A, Martinez O, Chua MA, García-Sastre A. Recombinant Newcastle Disease Virus as a Vaccine Vector for Cancer Therapy. *Mol Ther*. 2008;16(11):1883–90.
111. Dias JD, Hemminki O, Diaconu I, Hirvonen M, Bonetti A, Guse K, et al. Targeted cancer immunotherapy with oncolytic adenovirus coding for a fully human monoclonal antibody specific for CTLA-4. *Gene Ther*. 2012;19(10):988–98.
112. Frentzen A, Yu Y a, Chen N, Zhang Q, Weibel S, Raab V, et al. Anti-VEGF single-chain antibody GLAF-1 encoded by oncolytic vaccinia virus significantly enhances antitumor therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(31):12915–20.

113. Malhotra S, Kim T, Zager J, Bennett J, Ebright M, D'Angelica M, et al. Use of an oncolytic virus secreting GM-CSF as combined oncolytic and immunotherapy for treatment of colorectal and hepatic adenocarcinomas. *Surgery*. 2007;141(4):520–9.
114. Adelfinger M, Bessler S, Frentzen A, Cecil A, Langbein-Laugwitz J, Gentschev I, et al. Preclinical testing oncolytic vaccinia virus strain GLV-5b451 expressing an anti-VEGF single-chain antibody for canine cancer therapy. *Viruses*. 2015;7(7):4075–92.
115. Kasai K, Nakashima H, Liu F, Kerr S, Wang J, Phelps M, et al. Toxicology and Biodistribution Studies for MGH2.1, an Oncolytic Virus that Expresses Two Prodrug-activating Genes, in Combination with Prodrugs. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2013;2(August):e113.
116. Dmitrieva N, Yu L, Viapiano M, Cripe TP, Chiocca EA, Glorioso JC, et al. Chondroitinase ABC I-mediated enhancement of oncolytic virus spread and antitumor efficacy. *Clin Cancer Res*. 2011;17(6):1362–72.
117. Kuhn I, Harden P, Bauzon M, Chartier C, Nye J, Thorne S, et al. Directed evolution generates a novel oncolytic virus for the treatment of colon cancer. *PLoS One*. 2008;3(6):1–11.
118. Foloppe J, Kintz J, Futin N, Findeli A, Cordier P, Schlesinger Y, et al. Targeted delivery of a suicide gene to human colorectal tumors by a conditionally replicating vaccinia virus. *Gene Ther*. 2008;15(20):1361–71.
119. Bofill-De Ros X, Villanueva E, Fillat C. Late-phase miRNA-controlled oncolytic adenovirus for selective killing of cancer cells. *Oncotarget*. 2015;6(8):6179–90.
120. Mao L jun, Zhang J, Liu N, Fan L, Yang D rong, Xue B xin, et al. Oncolytic virus carrying shRNA targeting SATB1 inhibits prostate cancer growth and metastasis. *Tumor Biol*. 2015;36(11):9073–81.
121. Baertsch M a, Leber MF, Bossow S, Singh M, Engeland CE, Albert J, et al. MicroRNA-mediated multi-tissue detargeting of oncolytic measles virus. *Cancer Gene Ther*. 2014;(April):1–8.