



**UNIVERSIDAD ALFONSO X EL SABIO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**PROGRAMA DE DOCTORADO
BIOLOGÍA REGENERATIVA Y NUEVAS TERAPIAS**

TESIS DOCTORAL

**INMUNOTERAPIA AVANZADA COMO TRATAMIENTO DE TUMORES
CANINOS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

**Autora:
Clara Martín Carrasco**

Directora: Ana Judith Perisé Barrios
Codirector: Javier García Castro

Madrid, 2023



UNIVERSIDAD ALFONSO X EL SABIO
***DOCTORADO EN BIOLOGÍA REGENERATIVA Y
NUEVAS TERAPIAS***
INFORME DEL DIRECTOR
SOBRE IDONEIDAD DE LA TESIS DOCTORAL

Villanueva de la Cañada, 22 de febrero de 2023

La Directora, **Dra. Ana Judith Perisé Barrios**, de la Tesis Doctoral titulada «**INMUNOTERAPIA AVANZADA COMO TRATAMIENTO DE TUMORES CANINOS**» de la doctoranda **D.ª Clara Martín Carrasco**, declara que dicho trabajo es **apto para la defensa ante el Tribunal que valorará la obtención del título de Doctor.**

Fdo. La Directora de la Tesis Doctoral
Ana Judith Perisé Barrios

FPR21M/00



UNIVERSIDAD ALFONSO X EL SABIO
DOCTORADO EN BIOLOGÍA REGENERATIVA Y
NUEVAS TERAPIAS
INFORME DEL DIRECTOR
SOBRE IDONEIDAD DE LA TESIS DOCTORAL

Villanueva de la Cañada, 01 de marzo de 2023

El Director, **Dr. JAVIER GARCÍA CASTRO**, de la Tesis Doctoral titulada «*INMUNOTERAPIA AVANZADA COMO TRATAMIENTO DE TUMORES CANINOS*» del doctorando **D.ª Clara Martín Carrasco**, declara que dicho trabajo **es apto para la defensa ante el Tribunal que valorará la obtención del título de Doctor.**

Firmado por GARCIA CASTRO, JAVIER
(FIRMA) el día 01/03/2023 con un
certificado emitido por AC DNIE 004

Fdo. El Director de la Tesis Doctoral
Dr. JAVIER GARCÍA CASTRO

FPR21M/00

A mi familia, por su apoyo incondicional y a mi marido por ser y estar siempre.

AGRADECIMIENTOS

Querría expresar mis agradecimientos, en primer lugar, a todas aquellas personas que me han dado la oportunidad de realizar este proyecto, han confiado en mí y me han acogido con los brazos abiertos desde el primer día.

A mi directora de tesis, la Dra. Ana Judith Perisé Barrios por toda la inmensa y eterna paciencia, confianza y persistencia en cada uno de los días que llevamos trabajando en este proyecto. Así mismo a mi codirector el Dr. Javier García Castro y tutor el Dr. Fernando Vázquez, por su disposición y ayuda.

Gracias a Don José María Rojas y María Rosario Baquero por la confianza depositada en mí y darme esta oportunidad.

A todos mis compañeros de laboratorio que me han ayudado en cada paso con su enorme compañerismo y apoyo incondicional: Beatriz, Víctor, Pablo y María; sin olvidar a Paula que fue el motor de los primeros días en el laboratorio.

También me gustaría agradecer de todo corazón a todos mis compañeros veterinarios del Hospital Clínico Veterinario de la UAX por ofrecerme su colaboración y ánimo en todo momento.

En especial a mi Servicio de Cirugía de Pequeños Animales por comprender siempre la dualidad de estos años y seguir apoyándome cada día. Covadonga Sánchez-Mellado, José Luis Martínez y Raúl López, gracias por todo.

A mis compañeros veterinarios, y más que compañeros, amigos, que han estado para celebrar cada pequeña victoria y tirar de mí en los días no tan buenos, estoy segura de que nada habría sido igual sin vosotros y no habría llegado ni de lejos a donde me encuentro hoy. Manuel Carrillo, Federica del Ry, Rocío Cañellas, Emma Delgado, Lucía Pereira y Beatriz Alcocer, gracias por estar siempre.

A mis padres y hermanos por ser el pilar donde siempre me podré agarrar y jamás dejarán de cuidarme y apoyarme en cualquier momento pasado y futuro. Y a la familia García Muñiz por tratarme como una hija desde el primer día.

Y por último, dar las gracias a mi apoyo incondicional, que tira de mí en cada paso difícil y siempre se alegra más por mis logros que yo misma. Gracias a mi marido Rafael García por estar siempre a mi lado, nada de lo que soy hoy habría sido posible sin ti.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	12
RESUMEN	15
SUMMARY.....	17
INTRODUCCIÓN	20
CÁNCER EN MEDICINA VETERINARIA	20
<i>Factores de riesgo.....</i>	20
<i>Opciones terapéuticas en medicina veterinaria</i>	21
<i>Incidencia.....</i>	22
<i>Carcinoma</i>	23
<i>Carcinoma de células escamosas oral y nasal.....</i>	23
<i>Metástasis de carcinoma de células escamosas mamario en pared costal.....</i>	24
<i>Carcinoma pulmonar</i>	25
<i>Adenocarcinoma de la glándula apocrina de los sacos anales canino.....</i>	26
<i>Adenocarcinoma nasal.....</i>	28
SISTEMA INMUNE Y CÁNCER	29
INMUNOTERAPIA COMO TRATAMIENTO ONCOLÓGICO.....	32
<i>Virus replicativos condicionales y oncolíticos (OV).....</i>	36
<i>Adenovirus.....</i>	38
ICOCAV15.....	40
OBJETIVOS.....	44
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
MATERIAL Y MÉTODOS.....	46
DISEÑO DEL ESTUDIO	46
<i>Periodo del estudio.....</i>	46
<i>Población del estudio.....</i>	46
<i>Criterios de Inclusión:</i>	46
<i>Criterios de Exclusión:.....</i>	47
<i>Recogida de datos</i>	47
<i>Sedación y anestesia.....</i>	48
<i>Pruebas de imagen.....</i>	49
<i>Toma de biopsias.....</i>	50
<i>Preparación y la administración del tratamiento.....</i>	51
<i>Muestreo y seguimiento de los pacientes tras la administración del virus.....</i>	51
<i>Método de eutanasia</i>	53
<i>Necropsia y toma de muestras post-mortem</i>	53
SEGURIDAD Y EFICACIA	53
<i>Exploración física.....</i>	53
<i>Calidad de vida</i>	54
<i>Analíticas sanguíneas.....</i>	55
EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE DNA DE ICOCAV15	57
CITOMETRÍA DE FLUJO	57
INMUNOHISTOQUÍMICA.....	58
ANTICUERPOS ANTI-CAV2	59
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	60
RESULTADOS	62
PACIENTES DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	62
EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD DEL TRATAMIENTO INTRATUMORAL CON ICOCAV15.....	66
EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE VIDA DURANTE EL TRATAMIENTO	72

RESPUESTA DE LOS TUMORES TRATADOS.....	74
BENEFICIO CLÍNICO DEL TRATAMIENTO CON ICOCV15.....	75
EVALUACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL.....	77
EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE.....	78
BIODISTRIBUCIÓN DE ICOCV15 Y RESPUESTA ANTIVIRAL.....	85
DISCUSIÓN.....	90
CONCLUSIONES.....	102
BIBLIOGRAFÍA.....	104
ANEXOS.....	115
ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO DE ENSAYO CLÍNICO.....	116
ANEXO 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL ÁREA DE COMUNICACIÓN.....	119
ANEXO 3. CONSENTIMIENTO INFORMADO DE ANESTESIA.....	120
ANEXO 4. CONSENTIMIENTO INFORMADO DE CONTRASTE INTRAVENOSO.....	121
ANEXO 5. CONSENTIMIENTO INFORMADO DE PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO.....	122
ANEXO 6. CONSENTIMIENTO INFORMADO DE EUTANASIA.....	123
ARTÍCULO CIENTÍFICO: SAFETY AND EFFICACY OF AN ONCOLYTIC ADENOVIRUS AS AN IMMUNOTHERAPY FOR CANINE CANCER PATIENTS.....	124

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Principales opciones terapéuticas en la oncología veterinaria</i>	22
<i>Figura 2. Incidencia de los tumores más comunes en perros.</i>	23
<i>Figura 3. Representación gráfica de la inmunoedición</i>	31
<i>Figura 4. Principales inmunoterapias</i>	33
<i>Figura 5. Protocolo de preparación de la terapia CAR-T</i>	35
<i>Figura 6. Procesamiento y presentación de antígenos mediado por las células dendríticas</i>	36
<i>Figura 7. Esquema de estructura de adenovirus</i>	38
<i>Figura 8. Mecanismo de replicación selectiva de los adenovirus oncolíticos</i>	39
<i>Figura 9. Esquema de las modificaciones de la secuencia genética de ICOCV15 e ICOCV17 frente a sus predecesores, el virus salvaje original (CAV2) y su primera modificación (CAV2RGD)</i>	40
<i>Figura 10. Mecanismo de replicación condicional de ICOCV15</i>	41
<i>Figura 11. Medida directa de la lesión en el PSit04 con pie de rey</i>	49
<i>Figura 12. Medida plano dorsal mediante CT de la lesión en PSit06</i>	50
<i>Figura 13. Esquema de toma de biopsia con punch o tru-cut.</i>	50
<i>Figura 14. Administración de tratamiento intratumoral con aguja de 23G</i>	51
<i>Figura 15. Peine del ELISA en fase sólida, utilizado para la determinación de anticuerpos anti-CAV</i>	60
<i>Figura 16. Paciente PSit07</i>	64
<i>Figura 17. Paciente PSit08</i>	65
<i>Figura 18. Análisis de hematocrito desde el inicio (pre) y durante el primer año de tratamiento.</i> ..	67
<i>Figura 19. Análisis de plaquetas desde el inicio (pre) y durante el primer año de tratamiento.</i>	67
<i>Figura 20. Análisis de leucocitos desde el inicio (pre) y durante el primer año de tratamiento.</i>	68
<i>Figura 21. Análisis de la enzima aspartato aminotransferasa (AST) desde el inicio (pre) y durante el primer año de tratamiento</i>	69
<i>Figura 22. Análisis de la enzima alanina aminotransferasa (ALT) desde el inicio (pre) y durante el primer año de tratamiento</i>	69
<i>Figura 23. Análisis de albúmina desde el inicio (pre) y durante el primer año de tratamiento.</i>	70
<i>Figura 24. Análisis de tiempo de protrombina (TP) desde el inicio (pre) y durante el primer año de tratamiento.</i>	70
<i>Figura 25. Análisis de tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) desde el inicio (pre) y durante el primer año de tratamiento</i>	71
<i>Figura 26. Análisis de creatinina desde el inicio (pre) y durante el primer año de tratamiento.</i>	71
<i>Figura 27. Representación de los resultados obtenidos en los cuestionarios de calidad de vida de los pacientes</i>	73
<i>Figura 28. Respuesta local al tratamiento con ICOCV15 de los perros con carcinoma de células escamosas (SCC).</i>	74
<i>Figura 29. Evolución del adenocarcinoma nasal (PSit06) y de la metástasis del SCC en la pared costal (PSit09) mediante tomografía computarizada (CT).</i>	75
<i>Figura 30. Respuesta clínica y tiempo de supervivencia de los perros tratados con ICOCV15.</i>	76
<i>Figura 31. Supervivencia global de los perros tratados con ICOCV15</i>	78
<i>Figura 32. Inmunofenotipado en sangre periférica de los perros tratados con ICOCV15.</i>	79
<i>Figura 33. Inmunofenotipado en sangre periférica de los perros tratados con ICOCV15.</i>	80
<i>Figura 34. Inmunofenotipado en sangre periférica de los perros tratados con ICOCV15</i>	81
<i>Figura 35. Infiltrado inmune en los tumores tratados.</i>	83
<i>Figura 36. Detección de ICOCV15 mediante inmunohistoquímica.</i>	87
<i>Figura 37. Respuesta antiviral durante el tratamiento</i>	88

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Factores de riesgo asociados con algunos de los tumores más comunes</i>	20
<i>Tabla 2: Clasificación de los tumores pulmonares caninos primarios</i>	26
<i>Tabla 3. Clasificación TNM para tumores caninos dérmicos y epidérmicos</i>	27
<i>Tabla 4. Clasificación recomendada para el estadiaje del adenocarcinoma de sacos anales caninos</i>	27
<i>Tabla 5. Cronograma del tratamiento con ICOCAV15, muestreo y pruebas de imagen</i>	52
<i>Tabla 6. Cuestionario de calidad de vida</i>	55
<i>Tabla 7. Características de los pacientes incluidos en el estudio</i>	62
<i>Tabla 8. Características de los pacientes, relacionadas con el diagnóstico, tratamiento y supervivencia</i>	64
<i>Tabla 9. Relación de pacientes en tratamiento quimioterápico previo al estudio</i>	66
<i>Tabla 10. Efectos secundarios hematológicos</i>	72
<i>Tabla 11. Respuesta clínica según RECIST en función del número de dosis administradas</i>	77
<i>Tabla 12. Células inmunes infiltradas en el tumor, marcador pronóstico CD31*</i>	84
<i>Tabla 13. Biodistribución de ICOCAV15</i>	86

ABREVIATURAS

- ACT** *Adoptive Cell Therapy*. Terapia Celular Adoptiva
- Ad** Adenovirus
- AGASACA** *Canine Apocrine Gland Anal Sac Adenocarcinoma*. Adenocarcinoma de la glándula apocrina de los sacos anales canino
- AJCC** *American Joint Committee on Cancer*
- ALT** Alanina aminotransferasa
- APC** *Antigen-presenting cells*. Células presentadoras de antígenos
- ASA** *American Society of Anesthesiologist*
- AST** Aspartato aminotransferasa
- BSD** *Baseline Sume Diameter*. Suma de los diámetros de la medida inicial
- CAR-T** *Chimeric antigen receptor T cell*. Linfocitos T con receptores quiméricos de antígenos
- CAV** *Canine Adenovirus*. Adenovirus canino
- CAV2** *Canine Adenovirus serotype 2*. Adenovirus Canino tipo 2 salvaje
- CID** Coagulación Intravascular Diseminada
- CR** *Complete Response*. Respuesta Completa
- DC** *Dendritic cell*. Célula dendrítica
- DPX** Dibutilftalato Poliestreno Xileno
- EMA** *European Medicines Agency*
- FBS** *Fetal Bovine Serum*. SÉRUM Fetal Bovino
- FCI** *Federation Cynologique Internationale*
- FDA** *Food and Drugs Administration*
- ICI** *Immune checkpoint inhibitors*. Inhibidores de puntos de control inmune
- IHC** *Immunohistochemistry*. Inmunohistoquímica.
- MHC** *Major Histocompatibility complex*. Complejo Mayor de Histocompatibilidad
- M.C.H** *Mean corpuscular hemoglobin*. Hemoglobina corpuscular media
- M.C.H.C** *Mean corpuscular hemoglobin concentration*. Concentración de hemoglobina corpuscular media
- M.C.V** *Mean corpuscular volumen*. Volumen corpuscular medio
- MDSC** *Myeloid-derived suppressor cells*. Células supresoras de origen mieloides
- M.P.V.** *Mean platelets volume*. Volumen plaquetar medio
- MST** *Median Survival Time*. Tiempo medio de supervivencia
- NIH** *National Institutes of Health*
- NKC** *Natural Killer Cell*. Linfocitos citolíticos naturales
- NKT** *Natural Killer T cell*. Linfocito T citolítico
- OS** *Overall survival*. La supervivencia global
- OV** *Oncolytic virus*. Virus Oncolítico
- OAds** *oncolytic adenovirus*. Adenovirus oncolítico
- PBS** *Phosphate Buffered Saline*. Solución Salina Tampón Fosfato
- PCR** *Polymerase Chain Reaction*. Reacción en Cadena de la Polimerasa
- PD** *Progressive Disease*. Enfermedad Progresiva
- P.D.W.** *Platelets distribution width*. Distribución de tamaño plaquetar
- PFS** *Progression-free survival*. Tiempo de supervivencia libre de progresión
- PR** *Partial Response*. Respuesta Parcial
- pRB** Proteína del Retinoblastoma

pv Partículas virales
R.C.W. *Red cell distribution width*. Distribución de tamaño de los glóbulos rojos
RECIST *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*
SCC *Squamous Cell Carcinoma*. Carcinoma de Células Escamosas
SD *Stable Disease*. Enfermedad estable
PSS *Physiological saline solution*. Suero salino fisiológico
TAA *Tumor-Associated Antigen*. Antígeno tumor-asociados
TAM *Tumor-associated macrophages*. Macrófagos asociados al tumor
TC Tomografía Computarizada
TIL *Tumor-Infiltrating Lymphocytes*. Linfocitos infiltradores de tumor
TME *Tumor Microenvironment*. Microambiente Tumoral
vp *Viral particles*. Partículas virales.
WHO *World Health Organization*. Organización Mundial de la Salud

RESUMEN

RESUMEN

Introducción

El cáncer en perros es una enfermedad que aumenta cada año, debido principalmente al aumento de la esperanza de vida de las mascotas. Los carcinomas y adenocarcinomas se encuentran entre los diez tumores más frecuentes diagnosticados en el perro, y se definen por ser el cáncer con origen en las células epiteliales, ya sean de recubrimiento en regiones externas como en internas. Representan un grupo heterogéneo de tumores con diferente patología y malignidad. Históricamente, han sido clasificados según el tejido y la estirpe celular de la que se originan, no obstante, su clasificación en veterinaria es compleja y su evolución, características y pronóstico dependen también de su localización. A grandes rasgos, podemos hacer una diferenciación si las células tumorales son exclusivas de recubrimiento considerados carcinoma como tal, o si son glandulares, denominados en este caso carcinomas adenomatosos o más comúnmente adenocarcinomas. La supervivencia de los perros que padecen estos tumores indica que existen distintas respuestas a las terapias comúnmente utilizadas en veterinaria como la quimioterapia, cirugía y en algunas ocasiones radioterapia. Habitualmente estos tratamientos presentan ciertos inconvenientes, como efectos de toxicidad por acción inespecífica, lesiones en tejidos sanos de la periferia tumoral, alto coste económico o poca disponibilidad en algunas situaciones. Sin embargo, el papel que juega el sistema inmune es fundamental en el control del crecimiento tumoral. La viroterapia lleva ganando fuerza desde principios del siglo XX como terapia contra el cáncer tras casos reportados de regresiones tumorales en personas que padecían infecciones virales. El primer virus oncolítico (OV) que recibió la aprobación de la *Food and Drugs Administration* (FDA) y la *European Medicines Agency* (EMA) fue Talimogene laherparepvec (Imlygic™) en el año 2015, para ser utilizado intratumoralmente en personas con melanoma. Numerosos estudios han observado que la lisis celular provocada por replicación viral selectiva en las células tumorales es crucial en su mecanismo de acción, ya que promueve también una respuesta inmune anti-tumoral.

Objetivo

Teniendo en cuenta los resultados prometedores de los tratamientos basados en OV en pacientes oncológicos, y debido a la baja efectividad y efectos no deseados de las terapias disponibles actualmente para perros, se propone administrar intratumoralmente el adenovirus (Ad) oncolítico canino ICOCAV15 a modo de uso compasivo para tratar carcinomas o adenocarcinomas accesibles, con el fin de evaluar la seguridad y eficacia de ICOCAV15 en perros.

Material y Métodos

Ocho perros que presentaban carcinomas o adenocarcinomas se trataron intratumoralmente con ICOCV15. Para evaluar la seguridad, se realizaron hemogramas, bioquímicas y pruebas de coagulación en sangre periférica. También se determinaron los anticuerpos anti-CAV (*canine adenovirus*). Se analizaron las poblaciones inmunes en sangre periférica y el infiltrado inmune en el tumor, así como la vascularización y la presencia de virus oncolítico. Se realizaron mediciones del tumor de forma macroscópica y mediante tomografías computarizadas (TC) para determinar la respuesta clínica según los criterios RECIST (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*). Este estudio de uso compasivo de ICOCV15 fue autorizado por el Comité de Evaluación Ética del Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid (COLVEMA).

Resultados

Cuatro pacientes mostraron respuestas parciales (*Partial Response, PR*), y todos ellos mostraron estabilización de la enfermedad (*Stable Disease, SD*) en diferentes momentos durante el seguimiento. Todos los perros mantuvieron una buena calidad de vida a lo largo del estudio y mostraron un aumento del 176% al 460% del tiempo medio de supervivencia (*Median Survival Time, MST*) en comparación con los datos publicados en perros tratados con quimioterapia. No se detectaron efectos secundarios graves debidos al tratamiento. La infiltración inmune en el tumor aumentó tras la administración del virus. Se detectó ICOCV15 en el tejido tumoral hasta 100 días después de la segunda dosis. Aumentaron los anticuerpos anti-CAV en sangre periférica en todos los pacientes tras cada dosis administrada.

Conclusiones

Considerando los resultados obtenidos, sugerimos que el tratamiento intratumoral de los carcinomas/adenocarcinomas caninos con ICOCV15 es seguro y bien tolerado por los perros, a las dosis evaluadas. El tiempo medio de supervivencia aumentó en todos los perros tratados, y alguno de ellos mostró una buena respuesta clínica superior al 60% de reducción del tamaño tumoral. Además, ICOCV15 indujo una mayor infiltración inmune en el tumor, sugiriendo que la eficacia no se debe únicamente al efecto lítico del virus, sino a la acción conjunta con el sistema inmune. Todos estos resultados sugieren que la eficacia de ICOCV15 debería estudiarse en un ensayo clínico más amplio, utilizándose como una nueva herramienta terapéutica en oncología veterinaria.

SUMMARY

Introduction

Cancer in dogs is a disease that is increasing every year, mainly due to the increased life expectancy of pets. Carcinomas and adenocarcinomas are among the ten most frequent tumors diagnosed in dogs, and are defined as epithelial cells originating cancers, including those covering external or internal regions. They represent a heterogeneous group of tumors with different pathology and malignancy. Historically, they have been classified according to the tissue and cell lineage from which they originate, however, their classification in veterinary medicine is complex and their evolution, characteristics and prognosis also depend on their location. We can make a differentiation if the tumor cells are exclusive of coating considered carcinoma as such, or if they are glandular, called as adenomatous carcinomas or adenocarcinomas. The survival of dogs with these tumors indicates that there are different responses to therapies in veterinary medicine such as chemotherapy, surgery and sometimes radiotherapy. These treatments usually have certain drawbacks, such as toxicity effects due to non-specific action, lesions in healthy tissues, high economic cost, or low availability in some countries. However, the role played by the immune system is fundamental in the control of tumor growth. Virotherapy has been acquiring importance since the early 20th century as an anticancer therapy due to case reports of tumor regression in people suffering from viral infections. The first oncolytic virus (OV) to receive Food and Drugs Administration (FDA) and European Medicines Agency (EMA) approval was Talimogene laherparepvec (Imlygic™) in 2015, for an intratumorally administration to people with melanoma. Numerous studies have observed that cell lysis caused by selective viral replication in tumor cells is essential in its mechanism of action, and it also promotes an anti-tumor immune response.

Objective

Considering the promising results of OV-based treatments in oncological patients, and due to the low effectiveness and undesirable effects of currently available therapies for dogs, we propose to administer the canine oncolytic adenovirus (Ad) ICOCAV15 intratumorally to treat carcinomas and adenocarcinomas to evaluate the safety and efficacy of ICOCAV15 in dogs.

Material and Methods

Eight dogs presenting carcinomas or adenocarcinomas were treated intratumorally with ICOCAV15. To assess safety, hemogram, biochemistry and peripheral blood coagulation tests were performed. Anti-CAV (canine adenovirus) antibodies were also determined.

Peripheral blood immune populations and immune cells infiltrated in the tumor were analyzed, as well as vascularization and the presence of oncolytic virus inside tumor. Tumor measurements were performed macroscopically or by computed tomography (CT) to determine clinical response according to RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors). This compassionate use of ICOCV15 was authorized by the Ethics Evaluation Committee of the Official College of Veterinarians of Madrid (COLVEMA).

Results

Four patients showed Partial Response (PR), and all of them showed Stable Disease (SD) at different times during follow-up. All dogs maintained good quality of life throughout the study and showed an increase of 176% to 460% in Median Survival Time (MST) compared to published data in dogs treated with chemotherapy. No serious side effects due to the treatment were detected. Tumor immune infiltration increased after virus administration. ICOCV15 was detected in tumor tissue up to 100 days after the second dose. Anti-CAV antibodies in peripheral blood increased in all patients after each dose of ICOCV15.

Conclusions

Considering presented data, we suggest that the intratumoral treatment with ICOCV15 for carcinomas/adenocarcinomas is safe and well tolerated by dogs, at the evaluated doses. The median survival time increased in all treated dogs, and some of them showed clinical responses reducing more than 60% the tumor size. In addition, ICOCV15 induced a greater immune infiltration in the tumor, suggesting that the efficacy is not only due to the lytic effect of the virus, but also due to the immune system response. All these results suggest that the efficacy of ICOCV15 could be studied in a more extensive clinical trial, used as a new therapeutic tool in veterinary oncology.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

CÁNCER EN MEDICINA VETERINARIA

La esperanza de vida de las mascotas aumenta cada vez más debido a los avances en medicina veterinaria, y de forma paralela aumenta la incidencia de tumores en estos animales, siendo mayor que en humanos, siendo un 40-50% de los perros mayores de 10 años los que fallecen por cáncer (1,2).

Factores de riesgo.

Los factores de riesgo con relación al cáncer son desgraciadamente muy numerosos y abarcan desde aspectos externos, como la exposición a productos químicos o contaminantes, o aspectos propios de los individuos como los factores genéticos. Se han identificado también factores de riesgo asociados con una mayor incidencia de algunos tumores caninos, como son la edad, el sexo o la raza (Tabla 1) (3). Los perros mayores de 7 años tienen más predisposición a desarrollar la enfermedad, la incidencia de tumores es mayor en las hembras que en los machos, lo cual, puede verse influenciado por la gran prevalencia de tumores de mama, siendo uno de los tumores con mayor incidencia y mayoritariamente presente en el sexo femenino. Entre las razas más prevalentes en la aparición de lesiones tumorales se encuentran *bóxer*, *retriever*, perros pastores ovejeros, *boyero de Berna*, *schnauzer* y mestizo entre otros (4–6). Algunos estudios más específicos señalan a algunas de ellas en concreto, como los *schnauzer*, con una prevalencia mayor en carcinoma de células escamosas (7).

Tipos de cáncer comunmente diagnosticados y sus posibles factores de riesgo asociados	
Cáncer	Factores de riesgo
Carcinoma Mamario	Obesidad, edad avanzada, dieta alta en grasa, castraciones a edades tardías, algunas razas (<i>springer spaniel</i> , <i>pointer</i> , caniche, <i>Boston terrier</i> , <i>dachshund</i> , pastor alemán, <i>chihuahua</i>)
Osteosarcoma	Peso alto, gran tamaño, edad avanzada, castraciones tempranas, algunas razas (<i>wolfhound</i> irlandés, san bernardo, gran danés, <i>rottweiler</i> , <i>setter</i> irlandés, <i>doberman</i> , <i>golden retriever</i> , <i>labrador retriever</i> , <i>leonberger</i>)
Carcinoma de células transicionales en la vejiga	Estar castrado, exposición a tóxicos de herbicidas, baños antipulgas frecuentes, edad avanzada, algunas razas (<i>scottish terrier</i> , <i>beagle</i> , pastor de Sheetland, <i>wirehaired fox terrier</i> , <i>west highland terrier</i>)
Mastocitoma	Edad avanzada, algunas razas (<i>boxer</i> , <i>rhodesian</i> , <i>vizsla</i> , <i>Boston terrier</i> , <i>weimaraner</i> , <i>shar-pei</i> , <i>bullmastif</i> , <i>pug</i> , <i>labrador retriever</i> , <i>american staffordshire terrier</i> , <i>golden retriever</i> , <i>setter</i> inglés, <i>pointer</i>)
Linfoma	Ambiente de fumador de tabaco, exposición a químicos con ácido 2,4-diclorofenoxiacético, edad avanzada, algunas razas (<i>bullmastif</i> , <i>boxer</i> , <i>scottish terrier</i> , <i>gordon setter</i> , <i>wolfhound</i> irlandés, <i>basset hound</i> , <i>golden retriever</i>)

Tabla 1. Factores de riesgo asociados con algunos de los tumores más comunes. Tabla adaptada (3).

Opciones terapéuticas en medicina veterinaria.

La terapia contra el cáncer ha ido desarrollándose, utilizando las herramientas disponibles en cada momento. La extirpación quirúrgica era el único método, con sus claras limitaciones a nivel de diagnósticos tempranos, poco frecuentes, y tan sólo si eran visibles. Tras el descubrimiento de los rayos X por Roentgen en 1895 y de la radioactividad por Marie Curie en 1898 se comenzaron a aplicar sobre el tumor de mama y aunque inicialmente provocó mucho furor pronto perdió el entusiasmo por su escasa precisión. La quimioterapia tiene sus orígenes en 1948, que fue introducida por Farber *et al.* con la aminopterina como tratamiento contra la leucemia.

Entre los tratamientos actuales en la clínica veterinaria encontramos la cirugía y quimioterapia, y más recientemente las terapias de hipertermia, fotodinamia y electroquimioterapia (3,8). En el caso de las terapias de hipertermia consisten en calentar el tejido tumoral hasta temperaturas de 39-45°C con resultados de citotoxicidad y reacción inmunológica, y se suelen utilizar en combinación con otras terapias (9). La terapia fotodinámica es un método mínimamente invasivo para tratar tumores superficiales, con baja tasa de toxicidad, que combina productos fotosensibles selectivos para las células tumorales para provocar el efecto citotóxico una vez de aplique la fuente de iluminación. Ha mostrado resultados en tumores superficiales en perros, gatos y caballos, pero aún necesita más investigación en medicina veterinaria (10). La electroquimioterapia consiste en permeabilizar la membrana celular de las células tumorales haciéndolas más sensibles a los fármacos quimioterápicos que se administren posteriormente. Es una de las técnicas con resultados muy prometedores en oncología veterinaria, pero también necesita más estudios para poder implantarla en los protocolos oncológicos veterinarios como primera línea de tratamiento (11,12). El tratamiento con radioterapia, pese a ser una opción que ofrece buenos resultados clínicos en algunos tumores concretos como en los tumores intranasales, lamentablemente no tiene un fácil acceso en nuestro país, por lo que no es una opción fácilmente accesible para la mayoría de los propietarios (13) (Figura 1).

En los últimos años, gracias a los avances en medicina humana, han ido ganando fuerza también en veterinaria otras opciones terapéuticas, como por ejemplo la inmunoterapia como tratamiento frente al cáncer (14,15). Sin embargo, la mayor parte de estas terapias, como por ejemplo el uso de virus oncolítico, no están autorizadas como tratamiento en medicina veterinaria y actualmente se encuentran en investigación (16,17).



Figura 1: Principales opciones terapéuticas en la oncología veterinaria. Imagen creada con BioRender.com

Incidencia.

La incidencia de tumores en perros es difícil de determinar debido a la inconsistencia de los datos reportados; aun teniendo esto en cuenta, los tumores localizados en la piel y el tejido subcutáneo son los que muestran mayor incidencia entre los pacientes caninos, siendo un tercio de los tumores diagnosticados, con una incidencia entre el 26 y 43% (2,3). Estos incluyen tumores de superficies epiteliales, como la piel, el sistema respiratorio, gastrointestinal y tractos urogenitales, y tumores de glándulas (3). Los tumores más comunes en el perro son, de mayor a menor incidencia, el mastocitoma, seguido del lipoma, histiocitoma, adenoma de glándulas perianales, adenomas de glándulas sebáceas, carcinoma de células escamosas (*Squamous Cell Carcinoma*, SSC), melanoma, fibrosarcoma, tumor de células basales, tumor maligno de vaina nerviosa periférica, papiloma, adenocarcinoma de glándula sudorípara y adenocarcinoma sebáceo (Figura 2) (3).

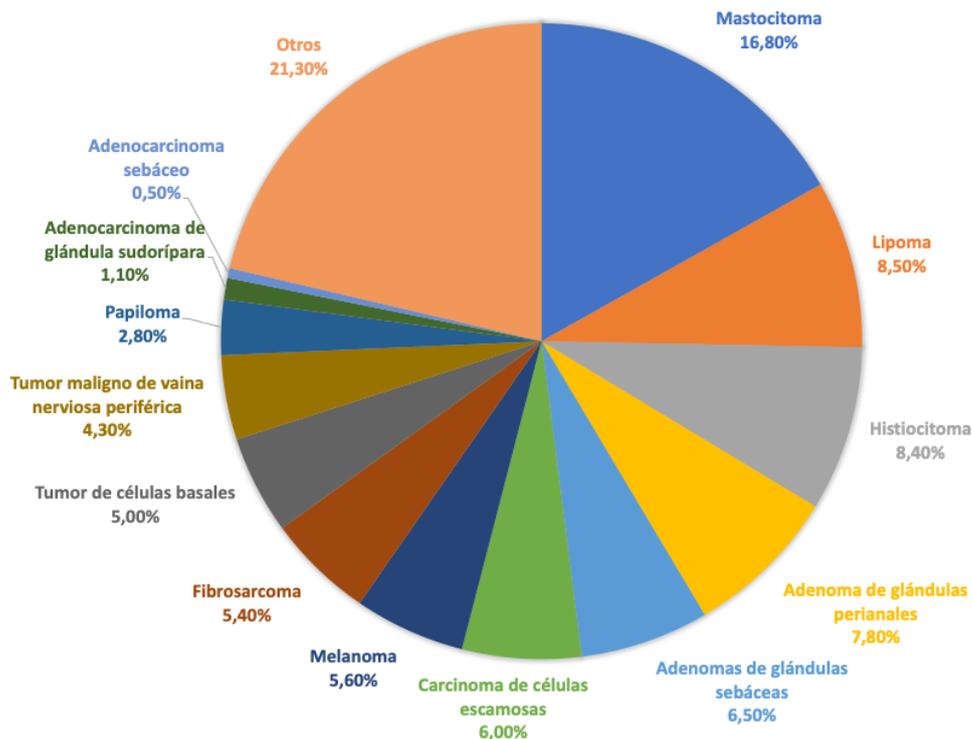


Figura 2. Incidencia de los tumores más comunes en perros. Datos tomados de (3).

Carcinoma

Según la definición del *National Institutes of Health* (NIH) de Estados Unidos, el carcinoma es el cáncer con origen en las células epiteliales, ya sea en aquellas que recubren las superficies externas de los órganos como las internas. Su clasificación en veterinaria es compleja y a grandes rasgos podemos diferenciar dos nomenclaturas según si las células son únicamente de recubrimiento que constituirían el grupo de los **carcinomas** o si las células son glandulares, refiriéndonos a los **adenocarcinomas**. En cuanto al pronóstico, evolución y característica de cada lesión depende, además de la estirpe celular, de la localización de la lesión. Teniendo en cuenta la gran diversidad de tumores dentro de esta estirpe, deben describirse las principales características, pronósticos y tratamientos de cada uno de forma independiente. A continuación, se incluyen únicamente los carcinomas presentados por los pacientes tratados en este estudio.

Carcinoma de células escamosas oral y nasal

El SSC corresponde al 5% de los tumores epiteliales en piel en perros y suele desarrollarse en zonas de piel clara. Pueden presentarse como lesiones erosivas o proliferativas y aunque suelen ser muy infiltrativas no suelen cursar con metástasis (3).

El **SCC oral no tonsilar**, que se describe como el SCC oral que no afecta a las amígdalas y base de la lengua, tiene una prevalencia del 17-28% entre los tumores orales en perros y afecta a perros de entre 8-10 años, sin que se hayan descrito diferencias entre sexos (18,19). La clínica de los animales que presentan SCC oral combina signos como incremento de la salivación, halitosis, disfagia o dolor al abrir la boca. El pronóstico del SCC oral rostral es bueno, siendo el tratamiento de elección la resección quirúrgica completa (20). En el caso de SCC rostrales, consiste en una maxilectomía o mandibulectomía, parcial o completa según la extensión del tumor, para conseguir al menos 1 cm de margen sin signos de malignidad alrededor de la región neoplásica, en la resección. Las principales complicaciones de la intervención son sangrados severos durante la cirugía, inflamación severa, epistaxis y dificultad para comer en el postquirúrgico inmediato, así como fístulas oronasales y traumas leves en el labio en el postquirúrgico a largo plazo. Ninguna de las complicaciones comprometen la vida del animal, por lo que se propone como una opción de tratamiento habitualmente (20). En los casos que no se consigue una resección completa, la combinación de tratamiento quirúrgico y radiación ha mostrado un tiempo medio de supervivencia libre de progresión (*progression-free survival*, PFS) de 34 meses (3,18,19).

El **SCC nasal** en la especie canina muestra una predisposición racial en *golden retrievers* y labradores, y los machos han mostrado una mayor incidencia (21). Comienza siendo una herida eritematosa que va avanzando hasta volverse ulcerativa. Provoca hemorragias locales, inflamación y en algunos casos oclusión de los ollares a causa de las lesiones erosivas y/o proliferativas (3,21). Tiene buen pronóstico si no es muy profundo cuando se trata con láser, criocirugía, quimioterapia intralesional, radioterapia y/o electroquimioterapia (21). La cirugía agresiva con márgenes amplios sin células tumorales suele conseguir buenos resultados (3,22,23). Aun teniendo en cuenta el resultado estético tras la resección del plano nasal, lo que suele ser una causa de rechazo por los propietarios, se considera que el tratamiento quirúrgico en monoterapia puede conseguir porcentajes curativos del 67% al 100%, y la recurrencia se asocia a márgenes que contienen células tumorales (3,22,23).

Metástasis de carcinoma de células escamosas mamario en pared costal

La gran mayoría de tumores malignos tienen capacidad de metástasis a tejido óseo por vía sanguínea. En el carcinoma mamario, las localizaciones más comunes incluyen las vértebras lumbares, la pelvis, las costillas, el húmero y el fémur. La incidencia de los carcinomas mamaros en perras no castradas es del 50-70% (3,24,25) con un MST de entre 3-18 meses sin tratamiento, dependiendo del grado y tipo histológico (3,25). En un estudio donde se hizo un seguimiento durante dos años de 229 perros con distintos tipos de tumor mamario maligno se observó que el ratio de metástasis fue del 100% para los carcinosarcomas, 89% para los carcinomas anaplásicos, 82% para los

comedocarcinomas, 65% para los carcinomas sólidos y 60% para los carcinomas adenoescamosos (25). Las neoplasias óseas cursan con dolor, inflamación del tejido adyacente y, en casos avanzados, pueden presentar fracturas (3). Teniendo en cuenta la gran variabilidad de las posibles metástasis, no resulta fácil realizar una comparativa en cuanto a protocolos de tratamiento y pronósticos.

Carcinoma pulmonar

El cáncer de pulmón primario en perros es muy poco frecuente, solamente representa el 1% de los tumores diagnosticados (26–28). En un estudio reciente con 340 perros con neoplasias pulmonares, se observó que la media de edad de aparición es de los 10 años, no existe predisposición por sexo, y los labradores fueron los más prevalentes con un 13%, además casi la totalidad de los tumores (87%) fueron diagnosticados como carcinomas (28). La sintomatología más común es intolerancia al ejercicio, toses frecuentes y otros signos respiratorios. En algunas ocasiones, son diagnosticados tras acudir para tratar un derrame pleural, hemotórax o pneumotórax (3,28).

El tratamiento de elección es quirúrgico, siempre y cuando sea una lesión única y el paciente esté lo suficientemente estable para soportar la anestesia y el periodo postquirúrgico. Cuando no se contempla como primera línea de tratamiento la cirugía, es debido a la localización, la invasión de órganos vecinos o presencia de metástasis a distancia o linfonodos afectados (3,26). La cirugía puede realizarse por toracoscopia, que es menos invasivo, o en el caso de grandes lesiones por toracotomía o esternotomía. Los avances en cirugía veterinaria permiten procedimientos mínimamente invasivos, favoreciendo una recuperación más rápida del paciente y reduciendo las complicaciones intraoperatorias (29). La radioterapia convencional tiene efectos graves negativos sobre el pulmón provocando fibrosis, no obstante, nuevos métodos de intensidad modulada están mostrando mejores resultados (3). Estudios sobre la quimioterapia metronómica reportan buenos resultados en pacientes con carcinomas avanzados donde la cirugía no puede reseca el tumor por completo, o si ya existen metástasis, sin toxicidades severas (26).

El pronóstico puede evaluarse según los síntomas, de manera que aquellos que no presentan sintomatología tienen un tiempo medio de supervivencia (*mean survival time*, MST) de 18 meses y aquellos que sí, de 8 meses (30,31). También puede evaluarse la MST según el estadio TNM (sistema de clasificación que tiene en cuenta el Tamaño del tumor, los Nódulos afectados, y las Metástasis existentes), siendo para un estadio T1 de 26 meses, para T2 de 7 meses y para T3 de 3 meses (30). No obstante, algunos autores opinan que esa clasificación se queda obsoleta y sería más recomendable adaptar la clasificación del estadio de tumor pulmonar en humanos basada en TNM, puesto que incluye más factores pronóstico, desarrolla mejor las características del tumor y puede orientar mejor al tratamiento y pronóstico para el paciente (Tabla 2) (27).

T				
		Tamaño (cm)	Solitario o Nódulos múltiples	Invasión de Órganos
	T1	</= 3	Solitario	Ninguno
	T2	> 3 a </= 5	Solitario	Pleura visceral, bronquio principal (no la carina)
	T3	> 5 a </= 7	Nódulos separados en mismo lóbulo	Pared torácica, pericardio, nervio frénico
	T4	> 7	Nódulos separados en lóbulos ipsilaterales	corazón, grandes vasos, n. laríngeo recurrente, carina, tráquea, esófago, médula espinal
N				
	N0	Sin metástasis en linfonódulos		
	N1	Linfonódulo traqueobronquial ipsilateral		
	N2	Metástasis en linfonódulo a distancia		
M				
	M0	Sin metástasis a distancia		
	M1	Efusión cél. cancerosa, metástasis contralateral, metástasis extratorácicas		

Estadio 1	T1, N0, M0
Estadio 2	T2, N0, M0; T3, N0, M0; T1-2, N1, M0
Estadio 3	T4, N0, M0; T3-4, N1, M0; T1-4, N2, M0
Estadio 4	T1-4, N1-2, M1

Tabla 2: Clasificación de los tumores pulmonares caninos primarios. Adaptada de la clasificación TNM utilizada en medicina humana (27).

Adenocarcinoma de la glándula apocrina de los sacos anales canino.

El adenocarcinoma de la glándula apocrina de los sacos anales canino (*Apocrine Gland Anal Sac Adenocarcinoma*, AGASACA) se presenta en las glándulas apocrinas de los sacos anales y es un tipo de tumor poco frecuente, representando el 17% de los tumores perianales y el 2% de los tumores que afectan a la piel. Presenta una prevalencia mayor en edades de 10-11 años (3,32). En anteriores trabajos se tendía a reportar una influencia mayor en hembras, aun no comprendiendo bien la fisiopatología, no obstante estudios más recientes han descartado diferencias en la incidencia debidas al sexo (32). Se presentan como masas en la región perianal, normalmente no dolorosas de crecimiento rápido que pueden llegar a ulcerarse. Es un tumor altamente invasivo, y el acompañamiento de la hipercalcemia aumenta la malignidad en el 25-53% de los casos (33). Presenta un potencial de metástasis muy alto, del 36-96% (34), desarrollándose en etapas muy tempranas siendo los linfonodos de la región sublumbar los más afectados. Las metástasis a distancia suelen presentarse habitualmente en pulmón, hígado, bazo, y hueso (30,34).

El diagnóstico se realiza mediante la exploración física, donde se puede evidenciar la presencia de una masa en los sacos anales mediante una palpación rectal, y debe confirmarse mediante citología o histología. Para el completo estadiaje será necesaria una ecografía abdominal para examinar los nódulos linfáticos y otros órganos, en especial el hígado y bazo, así como una radiografía torácica para evidenciar las posibles metástasis (3,32). El estadiaje según la clasificación TNM de la Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization, WHO*) para los tumores caninos con origen epidérmico o dérmico, es incompleto (Tabla 3), por lo que, se adopta uno más completo adaptado de medicina humana (Tabla 4) (33).

T: Tumor Primario
T _{is} Carcinoma preinvasivo (carcinoma <i>in situ</i>)
T ₀ No evidencia de tumor
T ₁ Tumor <2cm en su diámetro máximo, superficial o exofítico
T ₂ Tumor 2-5cm en su diámetro máximo, o con mínima invasión independientemente de su tamaño
T ₃ Tumor >5cm en su diámetro máximo, o con invasión del subcutáneo, independientemente de su tamaño
T ₄ Tumor que invade otras estructuras como fascia, músculo, hueso o cartílago
N: Nódulos linfáticos regionales
N ₀ Sin evidencias de afectación en linfonodos
N ₁ Linfonódulos ipsilaterales móviles
N _{1a} Linfonódulos sin crecimiento
N _{1b} Linfonódulos con crecimiento
N ₂ Linfonódulo móvil contralateral o bilateral
N _{2a} Linfonódulos sin crecimiento
N _{2b} Linfonódulos con crecimiento
N ₃ Linfonódulos fijos
M: Metástasis a Distancia
M ₀ Sin evidencias
M ₁ Metástasis a distancia detectada

Tabla 3. Clasificación TNM para tumores caninos dérmicos y epidérmicos, adaptada de la *World Health Organization* (31).

Estadio Clínico	T	N	M
Estadio 1	<2,5cm max diámetro	Ninguno	Ninguna
Estadio 2	>2,5cm max diámetro	Ninguno	Ninguna
Estadio 3a	Cualquier T	Presente >4,5cm mas diámetro	Ninguna
Estadio 3b	Cualquier T	Presente <4,5cm mas diámetro	Ninguna
Estadio 4	Cualquier T	Cualquier N	Presente

T, Tamaño del tumor primario; N, Tamaño de linfonódulos regionales; M, Metástasis a distancia; max, Máximo

Tabla 4. Clasificación recomendada para el estadiaje del adenocarcinoma de sacos anales caninos (33).

Los estudios sobre el AGASACA se encuentran limitados a estudios retrospectivos con mucha variabilidad, por lo que no existe un protocolo estandarizado de tratamiento (34). Entre las opciones de tratamiento actuales se encuentran la cirugía, la quimioterapia, la radioterapia (aunque desafortunadamente en España no es accesible a todos los pacientes por distribución geográfica), y la combinación de alguna de ellas. El tratamiento quirúrgico se basa en la resección de la lesión principal junto, si los hubiera y si son accesibles, los linfonodos afectados, ya que permite retirar de manera rápida gran volumen y ha mostrado buenos resultados también combinada con radioterapia hipofraccionada, en la que se administran fracciones más altas en menos sesiones con respecto a la radioterapia convencional (31,32,34,35). A pesar de que la cirugía puede ser una de las mejores opciones terapéuticas en el caso de no existir metástasis dada la alta morbilidad de la exéresis de los nódulos sublumbar, y la dificultad de reseccionar márgenes limpios, sin olvidar la probabilidad de producir incontinencia fecal por afección del esfínter anal, no se considera como primera línea de tratamiento (36). Los pacientes tratados quirúrgicamente con resección del tumor primario han mostrado una supervivencia de entre 7,9 y 18,4 meses desde el diagnóstico, siendo tiempos inferiores cuando se trata de tumores de más de 10 cm o con afección a linfonodos (32). A pesar de que se considera un tumor quimiorresistente, cuando se utiliza la quimioterapia en monoterapia, se obtienen tiempos de supervivencia de 6,9 a 8,7 meses, utilizando fármacos como mitoxantrona, agentes basados en platino, melfalán, 5-fluorouracilo o actinomicina D. No obstante, un estudio reciente con toceranib ha mostrado una supervivencia de 14,5 meses PFS de 10,4 meses (37). En monoterapia, la radiación es el tratamiento que ha mostrado una supervivencia mayor, llegando a los 21,6 meses (31,34,36). Sin embargo, igual que sucede en otros tumores, el tratamiento combinado es el que ha mostrado mayor supervivencia (31,4 meses), utilizando cirugía, radioterapia y quimioterapia con mitoxantrona (38). En los últimos años surgen nuevas opciones terapéuticas como la electroquimioterapia y la inmunoterapia, no obstante, no existe un protocolo establecido, por lo que la decisión clínica de tratamiento queda a criterio del especialista, que lo valorará teniendo en cuenta las características y estadio concreto de cada paciente (32).

Adenocarcinoma nasal

Las neoplasias que afectan a la cavidad nasal corresponden al 1-2% de los tumores diagnosticados en perros. Suelen aparecer en perro con una media de edad de 10 años y es más frecuente en razas medianas y grandes. Existen discrepancias sobre la mayor incidencia en machos, las razas dolicocefalas y perros que viven en ambientes urbanos, ya que solamente algunos autores sí describen una mayor incidencia en estos casos (30,39).

Los adenocarcinomas nasales se caracterizan por una invasión local progresiva y una ratio baja de metástasis. La sintomatología más frecuente se caracteriza por una historia

intermitente de descarga nasal, sanguinolenta y/o mucosa, normalmente unilateral. También pueden mostrar deformidades óseas por la erosión del hueso y progresión del tumor a través del tejido subcutáneo, dificultad respiratoria, sonidos estertores al respirar o descarga ocular por obstrucción del conducto nasolacrimal (30,39,40). Algunos estudios también detallan la importancia de incluir en el diagnóstico diferencial de las neoplasias que afectan a la cavidad nasal, signos neurológicos centrales (39). El diagnóstico debe constar al menos de una biopsia y una prueba de imagen, siendo la más recomendada la tomografía computarizada (*computer tomography*, CT) o la resonancia magnética (*magnetic resonance imaging*, MRI). La combinación más recomendable debería contar con una rinoscopia para poder observar el interior de la cavidad nasal y el nivel de afectación de los cornetes, determinar qué zonas están infiltradas y poder tomar muestras con visión directa. Las muestras deberían someterse a un estudio histopatológico y debería realizarse un cultivo para descartar causa fúngica o bacteriana de la lesión (40).

El pronóstico sin tratamiento es de unos 95 días, y algunos autores reportan la epistaxis como un factor negativo (30), mientras que otros no encontraron relación con el MST (41). El tratamiento quirúrgico es difícilmente abordable por la localización anatómica, y algunos estudios que sí han podido realizarlo reportan el mismo MST que en los perros no tratados (3). El tratamiento de elección es la radioterapia, y a pesar de que cursa con rinitis, descamación de la piel, queratoconjuntivitis y blefaritis, consigue MST entre 8 y 20 meses (3). Algunos estudios defienden la quimioterapia para aquellos pacientes que no pueden optar a la radiación por coste económico, o por limitada disponibilidad geográfica, y aun con un número reducido de participantes, describen beneficios al reportar MST de 9 meses (41).

SISTEMA INMUNE Y CÁNCER

La expresión génica dirige y controla todo el metabolismo celular, incluyendo los procesos de crecimiento, maduración e incluso la muerte celular. Sin embargo, podemos encontrar células que han perdido el control sobre el ciclo celular, y que por lo tanto presentan un crecimiento incontrolado; algunas de estas células tienen además la capacidad de invadir el tejido sano del organismo y se conocen como células tumorales (42). Los tumores se desarrollan como consecuencia de la proliferación de estas células tumorales, dando lugar a la enfermedad que se conoce como cáncer. La proliferación descontrolada de los tumores depende de muchos factores, que van a ser determinantes para la evolución de la enfermedad, como es la propia reprogramación celular, la capacidad de las células tumorales de evadir la respuesta inmune, su

resistencia a las señales de supresión del crecimiento, la capacidad de angiogénesis, así como la capacidad de migrar fuera del tumor para generar metástasis (43).

Se han reportado múltiples evidencias del papel del sistema inmune en la evolución del cáncer como la existencia de linfocitos T específicos de tumor (44), el aumento de la incidencia de determinados tumores en pacientes inmunodeprimidos y los casos de remisiones con el uso de inmunomoduladores (45,46). Incluso existen evidencias, aunque en una frecuencia muy reducida (1/60.000-100.000 casos), de casos reportados de remisiones espontáneas de tumores malignos sin tratamiento (47). A mediados del siglo XVIII ya se habían reportado múltiples casos de regresiones tumorales tras procesos infecciosos o febriles severos, pero no fue hasta los años 70 cuando se pudo demostrar el uso justificado de una bacteria para provocar regresiones tumorales (46,48). En 1957 surgió el concepto de inmunovigilancia, acuñado por el autor Burnet, según el cual el sistema inmune previene activamente el desarrollo de las neoplasias, sin embargo, en 1982 Thomas ya apuntaba a que el mayor problema de la inmunovigilancia es que no se podía demostrar su existencia en animales de experimentación. En cambio, la relación entre el sistema inmune y los antígenos tumorales se describió en 1991, cuando se demostró por primera vez la existencia de un antígeno tumoral reconocido por células T (44). Actualmente, ya se han descrito células que presentan una función de vigilancia inmune, como células del sistema inmune innato, las conocidas como células asesinas naturales (*natural killer*, NK), y los macrófagos, que son capaces de detectar y controlar a las células tumorales; también las células dendríticas, que pueden activar a los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ en el microambiente tumoral (42,45,49). No obstante, existen múltiples barreras para generar un inmunidad antitumoral totalmente efectiva y muchos tumores consiguen evadir la inmunovigilancia y crecen de forma descontrolada (42,45).

Actualmente, el concepto de la inmunovigilancia se incluye en la hipótesis de la inmunoedición, donde se pueden diferenciar tres fases de las interacciones entre el sistema inmune y el tumor: eliminación, equilibrio y escape (50,51) (Figura 3). La primera fase se basa en la detección y eliminación de las células tumorales por parte del sistema inmune, donde la inmunidad innata y adaptativa cooperan para eliminar a las células que expresan en su superficie alguna proteína mutada, neoantígenos tumorales o proteínas virales (51). En esta primera fase, los linfocitos T CD8⁺ inducen la apoptosis de las células tumorales mediante la interacción del TCR con el MHC de clase I. Las células presentadoras de antígenos (*antigen-presenting cells*, APC) presentan antígenos tumorales a los linfocitos T CD4⁺, induciendo así una respuesta inmune en la que aumenta la secreción de IL-2 e IFN- γ , contribuyendo a la activación de los linfocitos T CD8⁺; además, IFN- γ también suprime el crecimiento tumoral, aumenta la expresión del MHC y reduce la angiogénesis. Las células NK y los linfocitos T natural killer (*Natural killer T cells*, NKT) también contribuyen a la eliminación de las células tumorales,

principalmente mediante la liberación de gránulos citolíticos (52). Durante la fase de equilibrio, las células tumorales que no han podido eliminarse permanecen contenidas por el sistema inmune, pero continúan acumulando mutaciones, es la fase más larga y puede durar años (51). Finalmente, las células tumorales pueden evadir el sistema inmune mediante mecanismos diversos (fase de escape), como utilizando ligandos de CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*), PD-1 (*programmed death protein 1*) o PD-L1 (*programmed death ligand 1*) para anergizar a los linfocitos y evitar así ser eliminadas (53,54). Además, los macrófagos asociados al tumor (*tumor-associated macrophages*, TAM) están directamente relacionados con la progresión tumoral; las células supresoras de origen mieloide (*myeloid-derived suppressor cells*, MDSC) están relacionadas con la reducción de la acción de los linfocitos T en el entorno tumoral; y los linfocitos Treg, que se diferencian inicialmente desde los linfocitos T CD4⁺, se asocian con el crecimiento tumoral y con la promoción de metástasis (52). Todo ello les permite también metastatizar sin que el sistema inmune las detecte y elimine antes de la formación del nuevo tumor (Figura 3) (42,50,51). Por lo tanto, a pesar de que el sistema inmune es capaz de generar una respuesta antitumoral específica, debido a la capacidad evasiva de los tumores, hasta la fecha no es una respuesta suficientemente eficaz para evitar el desarrollo de todos los tumores.

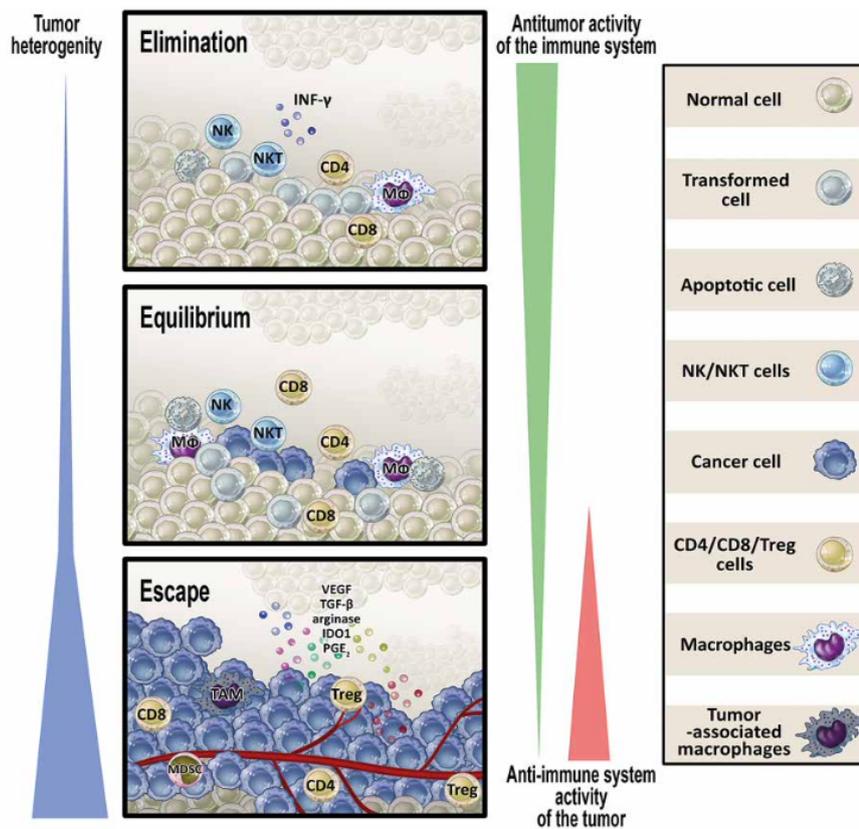


Figura 3. Representación gráfica de la inmunomodulación. Relación entre las células tumorales y la respuesta inmune. Imagen adaptada de (51).

La capacidad del sistema inmune para reconocer y eliminar tumores es un campo de investigación muy prometedor para el desarrollo de nuevas terapias en oncología; y es por ello que desde hace años, la comunidad científica y médica, están desarrollando terapias para potenciar las respuestas inmunes frente a los tumores (55).

INMUNOTERAPIA COMO TRATAMIENTO ONCOLÓGICO

Las terapias tradicionales como la quimioterapia, radioterapia o cirugía, y la combinación de ellas, no siempre son efectivas para tipos de tumor determinado o no siempre están disponibles para los pacientes. Debido a esta situación, y teniendo conocimiento de la implicación del sistema inmune en la evolución del cáncer, surgió un interés en la utilización de la inmunoterapia como tratamiento frente al cáncer (56). Desde hace años se trata de modificar o potenciar el sistema inmune de un organismo con la finalidad de contener o eliminar una enfermedad, y aunque la idea de utilizar el sistema inmune contra el cáncer se remonta hace ya más de un siglo, se siguen haciendo avances muy significativos y en los últimos años está revolucionando la terapia oncológica (46,57).

La inmunoterapia es un campo de conocimiento en crecimiento, y una realidad en la medicina humana con más de 2000 ensayos clínicos en proceso (58), y muestran unos resultados prometedores también en medicina veterinaria (59,60). La inmunoterapia como tratamiento oncológico aborda dos enfoques, por un lado, busca estimular aquellos mecanismos o respuestas anti-tumorales propias del sistema inmune, y por otro, contrarrestar los mecanismos tumorales que inhiben esas respuestas (44,61,62). Las células inmunes son la clave de la inmunoterapia por lo que entender qué implican los infiltrados de estas células en el microambiente tumoral es uno de los principales enfoques para investigar nuevos planes terapéuticos y mejorar los existentes (57,63). La mayoría de los tratamientos en inmunoterapia en medicina humana se basan en terapias con citoquinas, inhibidores de puntos de control inmune (*immune checkpoint inhibitors*, ICI), terapia celular adoptiva (*adoptive cellular therapy*, ACT) principalmente la terapia basada en linfocitos T con receptores quiméricos de antígenos (*chimeric antigen receptor T cell*, CAR-T), vacunación con antígenos tumorales y virus oncolíticos (57) (Figura 4). No obstante, pese a sus numerosas ventajas, la inmunoterapia no es inocua, y dependiendo del tipo de tratamiento, se generan distintos efectos secundarios. Esto implica que cada categoría de inmunoterapia, al igual que presentará un mecanismo específico de acción, presentará un perfil de toxicidad específico que será fundamental conocer y monitorizar en cada caso (64). En el caso de las terapias con citoquinas, a dosis altas se han visto efectos en las células T y NK, y a su vez aumento de

la permeabilidad de las células endoteliales. Las terapias con ICI bloquean algunas uniones entre las células tumorales y los linfocitos, para evitar la inactivación del sistema inmune, por lo que finalmente pueden provocar síndromes inflamatorios severos (64). En las inmunoterapias basadas en CAR-T, son comunes el síndrome de liberación de citoquinas, afecciones al sistema nervioso central, toxicidad cardiaca, gastrointestinal, hepática, pulmonar y renal principalmente (64,65). La vacunación con antígenos parece ser hasta ahora una terapia sin efectos negativos graves asociados (66). Las terapias con virus oncolíticos, hasta el momento, han reportado reacciones inflamatorias leves en el punto de inyección y síntomas gripales leves temporales tras la administración (62,65).

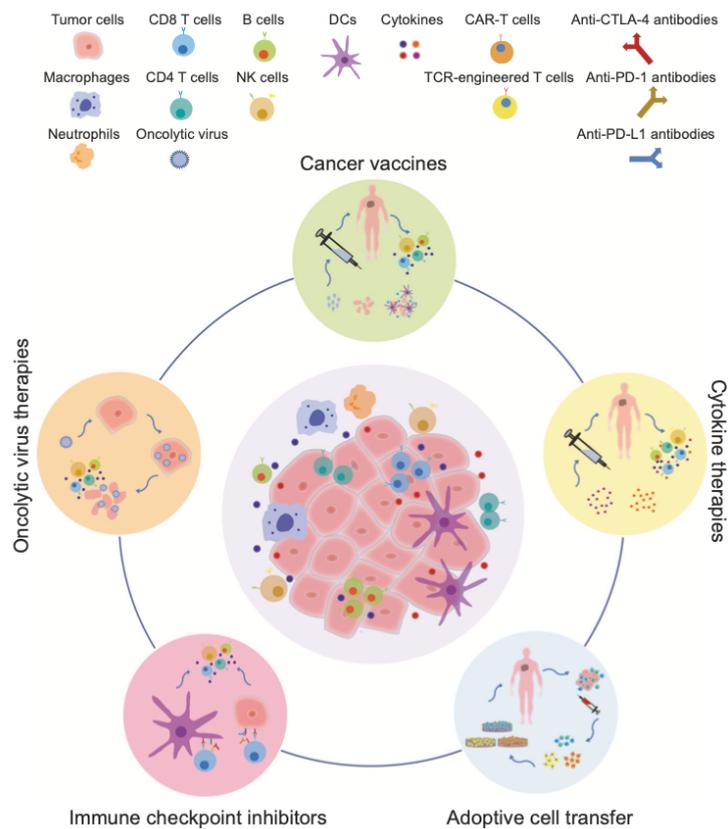


Figura 4. Principales inmunoterapias. Imagen adaptada de (57).

Algunas **citoquinas** como la IL-2, el IFN α y el IFN γ pueden participar en respuestas antitumorales del TME, sin embargo, su producción desregulada por parte de las células estromales, inmunitarias o tumorales puede estar también implicada en la progresión tumoral (67,68). El objetivo terapéutico se basa en aprovechar tanto los efectos inmunoestimulantes como bloquear sus acciones cuando se encuentren en producción desregulada (69). Las terapias con citoquinas no han mostrado grandes resultados beneficiosos en monoterapia como se esperaba, pero sin embargo sí parecen tener efecto en combinación con otras inmunoterapias (67). En medicina veterinaria no hay muchos estudios hasta el momento basados en esta terapia. En un estudio se utilizó la

terapia basada en citoquinas en conjunto con terapia basada en gen suicida, aplicada en pacientes en con carcinoma mamario tras el abordaje quirúrgico con buenos resultados (70).

La terapia basada en el **bloqueo de los puntos de control inmune** se basa en bloquear los puntos de control CTLA-4 y las interacciones entre PD-1 y PD-L1 que se producen en las células tumorales para evadir el ataque del sistema inmune (71,72). Esta terapia ha mostrado resultados prometedores en ensayos sin embargo no han obtenido la respuesta esperada en la terapia *in vivo* además de presentar efectos adversos relacionados con el sistema inmune en algunos de los pacientes (71). En medicina veterinaria se pudo identificar con éxito un anticuerpo anti-CTLA-4 canino alterando su interacción que justifica futuros estudios con pacientes caninos (73).

La **ACT** es una de las estrategias de la inmunoterapia más prometedoras. Se basa en utilizar las capacidades antitumorales de los linfocitos para eliminar las células tumorales. Los linfocitos son aislados en la sangre periférica, drenaje linfático tumoral o del propio tejido tumoral, son expandidos *ex vivo* y vuelven a ser administrados al propio paciente (61). Al utilizar una infusión de células T tumor-específicas autólogas, se amplifica la capacidad natural de reconocer y eliminar las células diana tumorales. Los linfocitos infiltrados en el tumor (TIL) indican que, en principio, la infusión de células T tumor-específicas puede afectar al crecimiento tumoral. No obstante, esta terapia ha tenido una respuesta completa y duradera hasta ahora únicamente en pacientes con melanoma (74). Entre los subgrupos se incluyen la terapia con TIL, terapia con receptores de células T, terapias con CAR T y con NK; siendo las terapias basadas en CAR-T las más prometedoras (Figura 5) (65). Las terapias con CAR-T en medicina veterinaria se encuentran todavía en investigación (75). Algunos estudios muestran la ACT como una opción segura en perros al no mostrar efectos adversos (76); mientras que en otros casos, sí han reportado uno de los efectos adversos comunes en pacientes humanos, el síndrome de liberación de citoquinas, en el tratamiento de un linfoma B canino (77). Aún son necesarios más resultados de seguridad y viabilidad de la preparación del tratamiento, antes de proponerla como terapia para la clínica habitual (76,77).

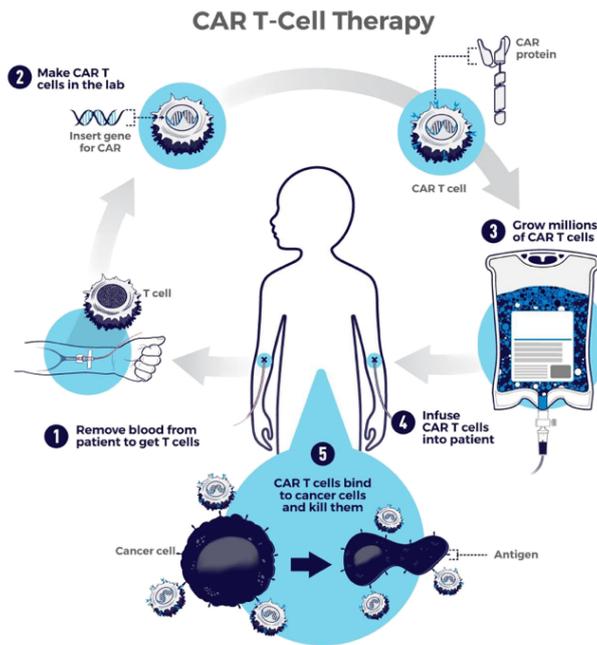


Figura 5. Protocolo de preparación de la terapia CAR-T. Imagen adaptada de (65).

Las vacunas contra el cáncer utilizan antígenos específicos de tumor, los **neoantígenos**, para desencadenar la respuesta inmune (57). La especificidad de los neoantígenos hace que su uso como vacuna para activar la propia respuesta inmune del organismo, sin riesgo de dañar células sanas, haya tomado importancia como nueva inmunoterapia en los últimos años. Estos neoantígenos, de forma natural, son expuestos en el MHC de las células dendríticas (*dendritic cells*, DC), tras ser captados en el tumor, y posteriormente son presentados a los linfocitos T, que serán los encargados de generar una respuesta anti-tumoral. La mayoría de las vacunas suelen consistir en la administración exógena de antígenos tumorales concretos combinados con coadyuvantes que activan a las DC o incluso introducidos en el interior de las propias DC (Figura 6) (78). Sin embargo, esta terapia no ha mostrado la efectividad terapéutica esperada, al no conseguir que las DC sean capaces de activar a los linfocitos T de forma eficiente (66). La mayoría de los estudios veterinarios hasta el momento se han realizado *in vitro*, o utilizando algunos modelos murinos, como, por ejemplo, con una vacuna de DNA de telomerasa canino, dado que la telomerasa se considera un antígeno asociado a tumores, que al inyectarse en ratones, se indujeron células T específicas de telomerasa (79).

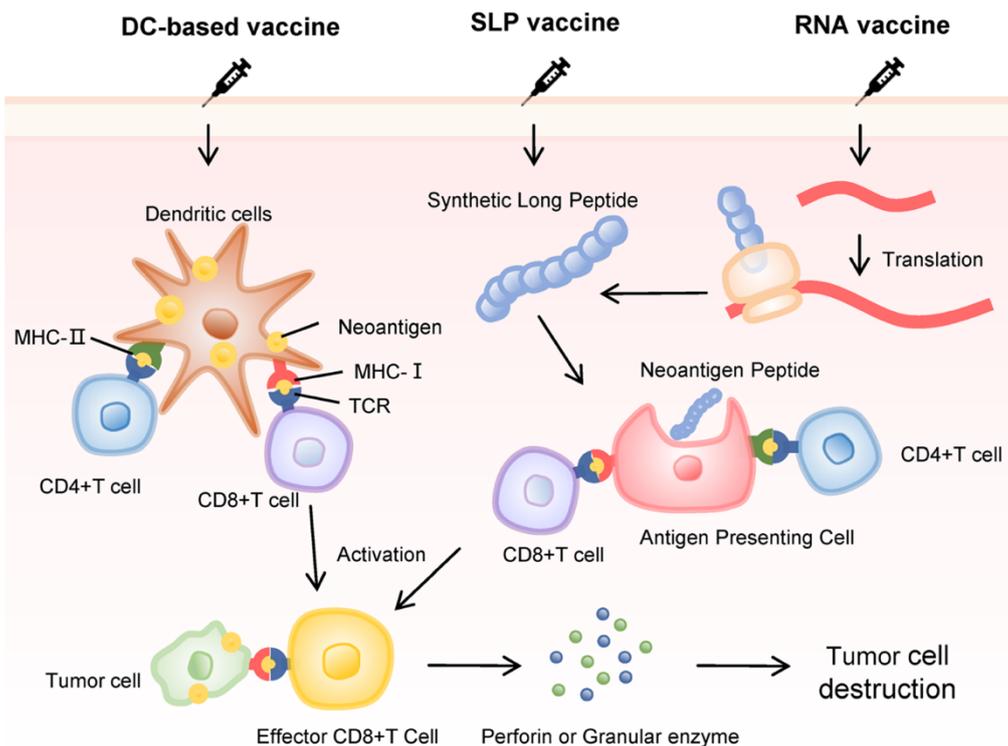


Figura 6. Procesamiento y presentación de antígenos mediado por las células dendríticas. Imagen adaptada de (66).

Virus replicativos condicionales y oncolíticos (OV)

El uso de virus oncolíticos se presenta como un campo muy interesante de estudio con resultados muy prometedores como tratamiento en terapia oncológica (80–83). Los virus de replicación condicional están diseñados para utilizar las diferencias clave entre las células diana y las del resto del organismo. El promotor del virus *wild type* puede sustituirse por promotores específicos de tejido, lo que permite la replicación viral sólo en las células diana, obteniendo entonces un efecto tejido-específico. Los virus oncolíticos son virus genéticamente modificados que utilizan rutas habitualmente alteradas en las células tumorales que favorecen su crecimiento, de tal forma que se produce una replicación selectiva en las células tumorales, a la vez que una toxicidad mínima para el resto de tejidos sanos (84). No obstante, se ha podido observar que además son capaces de inducir una respuesta inmune antitumoral, lo que aumenta la eficacia de la terapia (80,84–87). En 2015 el talimogen iaherparepvec, un herpes virus simple atenuado (*Herpes Simplex Virus*, HSV), fue el primer OV aprobado como tratamiento de melanoma en pacientes humanos por la *Food and Drug Administration* (FDA) y la *European Medicines Agency* (EMA), lo que facilitó y promovió el inicio de nuevos estudios basados en OV (85).

La inmunoterapia basada en virus oncolíticos mejora su eficacia cuando se combina con otras terapias, en concreto se han descrito buenos resultados cuando se utiliza en

combinación con otras inmunoterapias (88–90). Cuando los OV llegan al microambiente tumoral (*tumor microenvironment*, TME), pueden inducir citoquinas proinflamatorias desencadenar la expresión de neoantígenos tumorales, moléculas MHC clase I y PD-L1 por parte de las células neoplásicas, llegando a amplificar la respuesta inmune local y favoreciendo la llegada de células inmunes al tumor (91). Son múltiples los virus oncolíticos utilizados en inmunoterapia con pacientes oncológicos humanos, incluyendo, entre otros, herpesvirus, measles virus o virus del sarampión, coxsackievirus, poliovirus, retrovirus, parvovirus, virus de la estomatitis vesicular (*vesicular stomatitis virus*, VSV), virus de la enfermedad de New Castle y adenovirus.

Los herpesvirus son virus derivados de las modificaciones del HSV tipo 1 (HSV1). Se encuentran centrados en el Talimogen laherparepvec (Imlygic) y sus resultados favorables como tratamiento del melanoma así como regresiones de lesiones tumorales a distancia, sugestivas de favorecer la inmunidad antitumoral (92). El virus del sarampión ha mostrado seguridad y regresiones tumorales en estudios con modelos murinos (93), y se han obtenido respuestas tumorales en ensayos con pacientes con mieloma múltiple (94). Los coxsackievirus, además de sus propiedades oncolíticas, inducen una fuerte respuesta inmune (95,96). Han mostrado buenos resultados anti-tumor *in vitro* y en modelos animales (97) y se han reportado regresiones en pacientes con melanoma (98). El poliovirus despierta especial interés en tratamientos de tumores cerebrales por sus resultados positivos en modelos murinos de glioblastomas (99) y se han reportado aumentos de la supervivencia en pacientes con glioblastoma recurrente (100). Los retrovirus tienen una alta y rápida capacidad de proliferación y propagación a todas las células mitóticas. Su uso en modelos murinos muestra supervivencia a largo plazo e inmunidad antitumoral sistémica mediada por linfocitos T memoria (85). El parvovirus H1 está presente en estudios frente al glioblastoma y metástasis de cáncer pancreático (101). El virus de la estomatitis vesicular se ha modificado para que sobreexpresara interferón beta (IFN- β) (85), y se han obtenido aumento de la supervivencia en modelos murinos de tumor de ovarios y cáncer de mama en combinación con células NK (102). El virus de la enfermedad de Newcastle genera sincitios y apoptosis (103), pero sin embargo, son necesarios más estudios para confirmar su mecanismo de acción y eficacia (85). Los adenovirus fueron de los primeros OV utilizados en ensayos clínicos, debido a su gran capacidad de lisis tumoral, activación del sistema inmune (80), estabilidad, fácil modificación genética y baja patogenicidad. Además, son fáciles de producir en gran cantidad de titulación y pureza (104), y son vectores que no integran su material genético en el genoma celular para replicar, por lo que presentan una mayor seguridad frente a los virus que se integran en el genoma (85).

En medicina veterinaria, son varios los virus utilizados como terapia oncolítica, entre los que destaca el adenovirus (60), virus del sarampión (105), virus del moquillo (106), HVS, virus de la enfermedad de Newcastle (107), Reovirus (108) y vaccina virus (109). Aunque

muchos de ellos han obtenido resultados prometedores, los adenovirus siguen siendo los más usados en terapia oncológica veterinaria debido a su gran capacidad infectiva, título alto de producción, seguridad y fácil modificación genética (2,110).

Adenovirus.

El adenovirus (Ad) fue aislado por primera vez en 1953 en células adenoides humanas, y desde entonces se han identificado más de 100 especies (111,112). El adenovirus es un virus sin envuelta que presenta un DNA lineal de doble hebra (26-48kb aproximadamente) protegido por una cápside proteica icosaédrica de unos 950 Å de diámetro, excluyendo las fibras que protruyen de cada uno de ellos que, según el serotipo, tienen entre 110-370 Å de longitud (80,104) (Figura 7). El genoma viral codifica unidades de transcripción temprana (E1A, E1B, E2, E3 y E4) y de transcripción tardía (L1, L2, L3, L4 Y L5) que producen múltiples mRNA y proteínas durante la replicación del Ad (113).

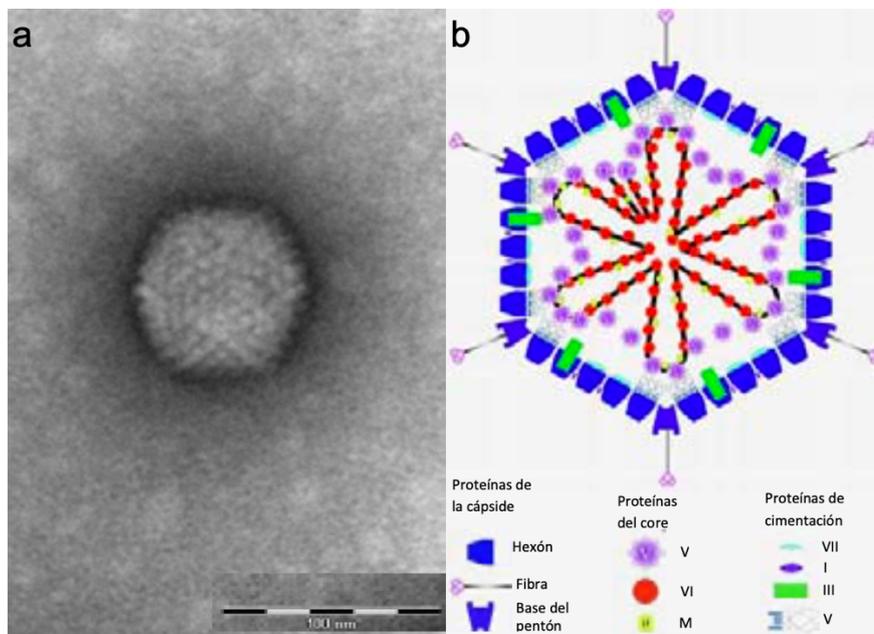


Figura 7. Esquema de estructura de adenovirus. Imagen adaptada de (114).

Los Ad no son capaces por sí mismos de tener una selectividad hacia las células tumorales, por lo que es necesario realizar modificaciones en el genoma para favorecer su acción oncolítica (86). Una de las principales modificaciones se basa en la delección de los genes virales requeridos para la división en las células sanas. Estas delecciones se complementan con las alteraciones en el fenotipo de las células neoplásicas haciendo que los adenovirus se repliquen sólo en células tumorales (115). Otra de las principales modificaciones que se realizan sobre el genoma de los Ads es la inserción de promotores tumor-específicos para controlar la replicación viral (86). El adenovirus ONYX015, que tiene una delección parcial del gen E1B, fue el primer Ad replicativo condicional

(*conditionally replicative adenovirus*, CRAd) (Figura 8) descrito, y fue aprobado en China en 2005 como tratamiento para los pacientes con cáncer de cuello y cabeza (116).

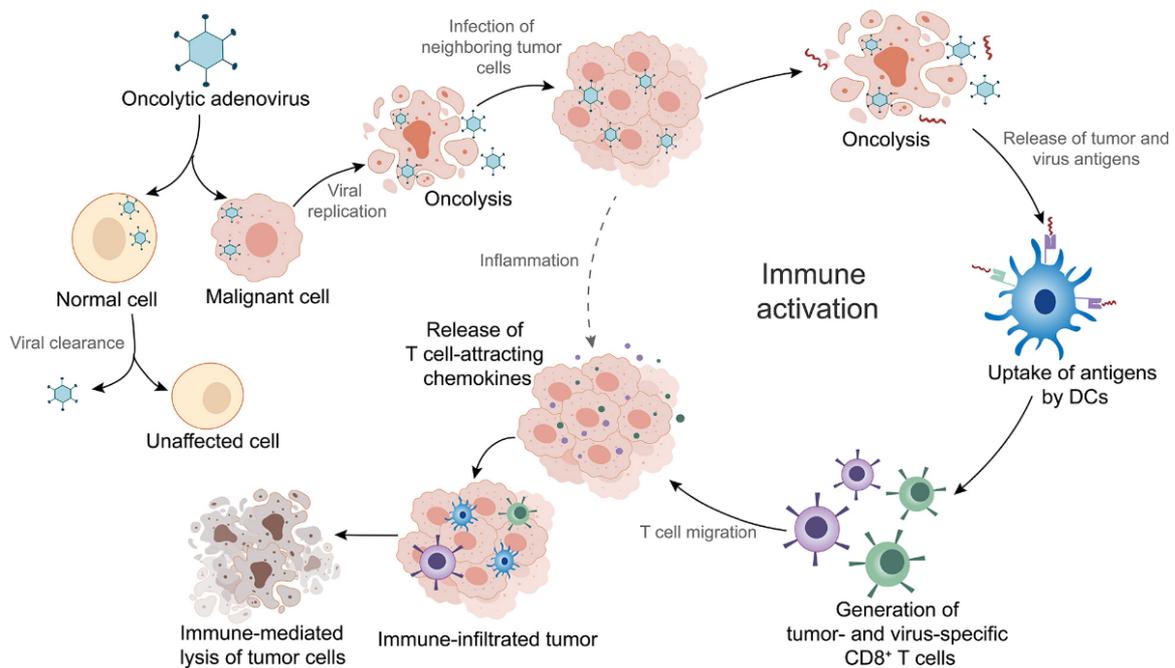


Figura 8. Mecanismo de replicación selectiva de los adenovirus oncolíticos. Imagen tomada de (80).

Los estudios con adenovirus han demostrado su seguridad como tratamiento, tanto en modelos murinos como en pacientes humanos y caninos, provocando, efectos secundarios leves y temporales entre los que se reportan dolor en el punto de inyección y síntomas gripales como cuadros de fiebre leve, dolor muscular leve generalizado o cansancio (61,116). Por el momento, los datos en medicina veterinaria son limitados, y por lo general no se han descrito efectos secundarios graves con el tratamiento con adenovirus oncolíticos (*oncolytic adenovirus*, OAd). No obstante, la administración local de OAd sí provocó en un paciente canino un cuadro grave de coagulación intravascular diseminada, aunque debido al número reducido de pacientes participantes en el estudio, no se puede establecer con certeza la relación causa-efecto (117).

El modo de administración de los OAd es un factor relevante para tener en cuenta, y son diversos los estudios que tratan de encontrar una vía de administración más eficaz que la administración intravenosa. La administración sistémica puede reducir la eficacia de la terapia, debido a la inactivación de partículas virales causada por la reacción del sistema inmune, tropismo viral por otros tejidos y dificultad de alcance de la lesión objetivo a una concentración suficiente. Es necesario, por tanto, explorar otras vías de administración, como ya se ha hecho con el uso de células madre mesenquimales o liposomas como vehículos para direccionar y aumentar la cantidad de partículas virales

capades de infectar las células tumorales, y evitar así la retención y/o neutralización del virus en el organismo antes de alcanzar la lesión objetivo. Las inoculaciones locales también son una alternativa factible para los tumores accesibles (44,60,118,119). De hecho, la administración local tiene beneficios frente a la sistémica como por ejemplo optimizar la concentración de virus en la lesión a tratar, reduciendo la dosis utilizada, o asegurar la llegada del virus a la(s) lesión(es) objetivo, ya sea un tumor aislado o con distintas metástasis que puedan ser inoculadas directamente (120).

ICOCAV15

El adenovirus oncolítico que utilizamos en este estudio, ICOCAV15, está basado en el adenovirus canino serotipo 2 salvaje (*canine adenovirus serotype 2*, CAV-2) con un motivo RGD insertado en la fibra para aumentar su infectividad (CAV2RGD) (114) (Figura 9). También tiene una modificación del promotor endógeno E1a, mediante la inserción de cuatro sitios de unión a E2F y la supresión del dominio de unión a la proteína del retinoblastoma (pRB) (E1aD21) (Figura 9). Estas modificaciones le otorgan la característica de replicación condicional, asegurando que solo podrá finalizar el ciclo viral en aquellas células con el promotor de E2F activado, hecho que sucede también cuando la vía del retinoblastoma se encuentra desregulada, como es el caso de la mayoría de las células tumorales (117,121,122).

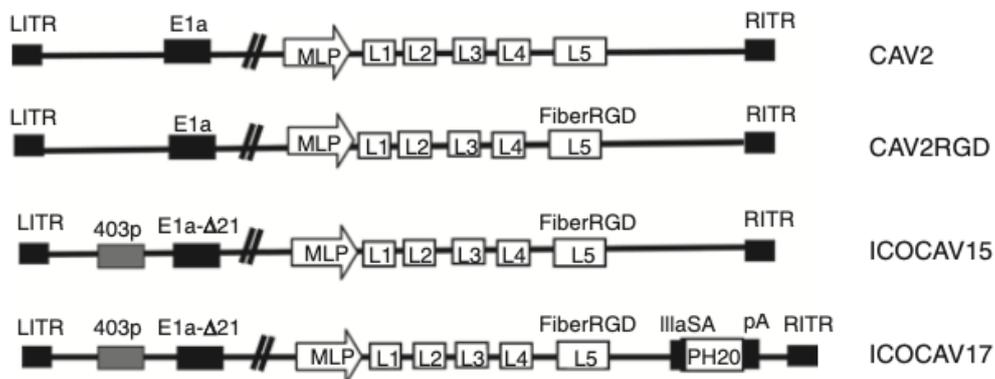


Figura 9. Esquema de las modificaciones de la secuencia genética de ICOCAV15 e ICOCAV17 frente a sus predecesores, el virus salvaje original (CAV2) y su primera modificación (CAV2RGD). Imagen tomada de (117).

Cuando se une la pRB no fosforilada al promotor E2F, reprime la transcripción celular. Tras la fosforilación de pRB, se rompe la unión pRB-E2F, E2F queda libre y se inicia la transcripción (Figura 10). La mayoría de las células tumorales presentan un exceso de E2F libre por una alteración en la pRB. La modificación de E1a en ICOCAV15 evita que el virus pueda finalizar su ciclo de replicación en células quiescentes, ya que no puede disociar la pRB de E2F. Sin E2F libre, la replicación no puede darse, y por lo tanto los

genes del adenovirus no se transcriben, y no se produce la lisis de las células sanas. Sin embargo, si se producirá en las células tumorales gracias al exceso de E2F libre (Figura 10) (123).

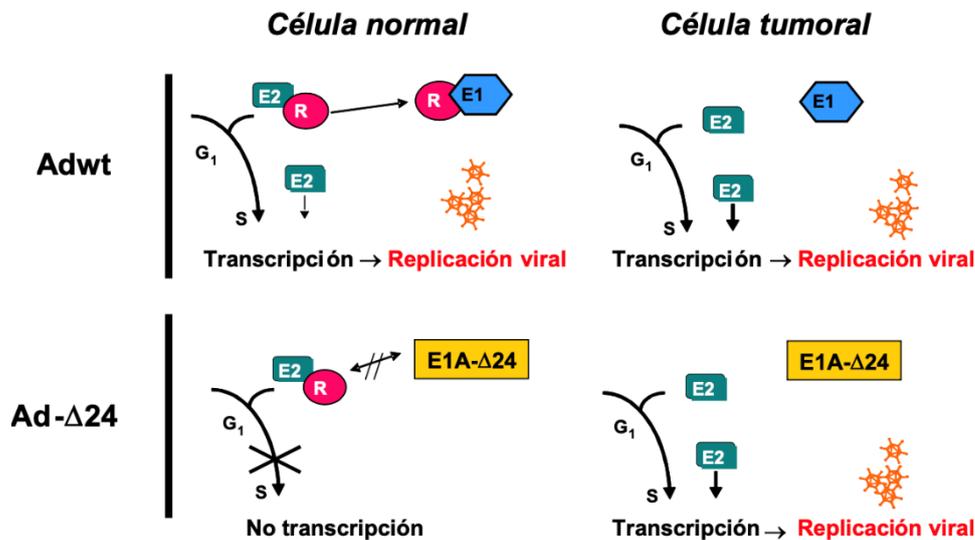


Figura 10. Mecanismo de replicación condicional de ICOCAV15. Imagen adaptada de (114).

Se han realizado varios estudios previos con ICOCAV como tratamiento de tumores caninos. En un estudio se trataron 6 perros con distintos tumores utilizando ICOCAV17 administrado de manera intratumoral. ICOCAV17 se diferencia de ICOCAV15 en que el primero se encuentra, además de las modificaciones mencionadas anteriormente, cargado con hialuronidasa, ya que el estroma de los tumores sólidos está compuesto por una matriz extracelular compuesta, entre otros, de ácido hialurónico, y esta enzima ayudaría a una mayor distribución del virus por la matriz extracelular (Figura 9). No se observaron efectos tóxicos relacionados directamente con el virus, excepto un caso de coagulación diseminada en uno de los pacientes, y obtuvieron reducciones del tumor entre 50-70% en dos de los pacientes y un claro aumento de la calidad de vida (117). En otro estudio se trataron 27 perros con tumores de distintos orígenes celulares, se administró de manera sistémica ICOCAV17 vehiculado mediante células madre mesenquimales caninas para favorecer el tropismo hacia el tumor y para proteger al virus de su posible eliminación por parte del sistema inmune. No se observaron efectos adversos y el ratio de respuesta fue del 74% incluyendo un 14,8% de respuestas completas (60).

La oncología veterinaria es una oportunidad única para contribuir al avance de la inmunoterapia ya que, desgraciadamente los modelos de ratones no siempre reflejan las condiciones de los pacientes oncológicos humanos y por tanto dificulta la inmunoterapia comparativa, en cambio, los perros desarrollan tumores de manera espontánea, son pacientes inmunocompetentes, presentan similares en la biología propia del tumor y viven en el mismo medio ambiente que los humanos (45). Estas circunstancias hacen de ellos un modelo adecuado para testar futuros tratamientos para los pacientes oncológicos humanos, y de forma paralela, poder tratar a los pacientes caninos.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo principal fue evaluar la seguridad y la eficacia del adenovirus oncolítico ICOCAV15 administrado localmente en pacientes caninos que presentaban carcinomas y adenocarcinomas mediante un estudio prospectivo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la seguridad de ICOCAV15 administrado localmente en tumores sólidos.
2. Determinar la eficacia de ICOCAV15 administrado intratumoralmente en carcinomas y adenocarcinomas.
3. Cuantificar los cambios en las poblaciones inmunes en sangre periférica debidos al tratamiento.
4. Cuantificar la respuesta inmune humoral antiviral.
5. Caracterizar las poblaciones inmunes infiltradas en los tumores tratados.
6. Determinar la permanencia viral en el tumor a largo plazo, así como el tropismo viral en otros órganos.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Este estudio tenía como objetivo principal, evaluar la seguridad del tratamiento con el adenovirus oncolítico ICOCAV15 a una dosis y pauta determinada; y, en segundo lugar, determinar la eficacia de este en tumores sólidos caninos. Fue un estudio prospectivo, con un único grupo de intervención debido a la autorización como uso compasivo del tratamiento, y los pacientes se incluyeron en el estudio siguiendo el criterio del investigador y el oncólogo. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética e Integridad Profesional (CEIVET) del Colegio de Veterinarios de Madrid (COLVEMA). Los propietarios de los pacientes participantes en el estudio mostraron su conformidad para participar y permitir las futuras publicaciones de resultados mediante la firma del Consentimiento Informado (Anexo 1), y del Consentimiento para el Área de Comunicación (Anexo 2).

Periodo del estudio.

Los pacientes se incluyeron en el estudio desde julio del 2019 hasta marzo del 2020, y el periodo de recogida de datos y revisiones presenciales se extendió hasta diciembre de 2021. Se realizó el seguimiento de los pacientes hasta el momento de su fallecimiento, el análisis de supervivencia continúa para dos pacientes en el momento de redacción de este documento (febrero 2023).

Población del estudio.

Se incluyeron 8 pacientes caninos oncológicos que acudieron al Servicio de Oncología del Hospital Clínico Veterinario Alfonso X el Sabio, de cualquier edad, raza o sexo, y que fueron diagnosticados de carcinoma o adenocarcinoma. Los tumores incluidos en el estudio fueron, adenocarcinoma de la glándula apocrina de los sacos anales canino (AGASACA), carcinoma de células escamosas (SSC), carcinoma pulmonar, adenocarcinoma nasal y metástasis de carcinoma mamario de células escamosas en pared costal.

Criterios de Inclusión:

- Pacientes caninos con diagnóstico presuntivo de carcinoma/adenocarcinoma accesible.
- Buen estado general determinado por su estado clínico, resultados de analítica sanguínea, urianálisis y pruebas de diagnóstico por imagen (exceptuando efectos y patologías derivadas del propio tumor).
- Carácter dócil que permita manejo sin necesidad de sedación química.
- Pacientes cuyos propietarios acepten las condiciones del estudio mediante la firma de un consentimiento informado específico (Anexo 1).

- Pacientes sin respuesta a tratamientos previos, o bien pacientes que rehúsen el tratamiento con quimioterapia convencional o cualquier tratamiento alternativo, como acupuntura u homeopatía, disponible.

Criterios de Exclusión:

- Perros con carácter agresivo.
- Detección de enfermedades intercurrentes.
- Pacientes en estado de gestación o lactancia.
- Pacientes con enfermedades concomitantes graves, tales como fallo renal crónico en estadio avanzado (IRIS 3 y 4) o fallo renal agudo, fallo hepático crónico avanzado o fallo hepático agudo, enfermedades infecciosas asociadas (leishmaniosis, erliquiosis, ...) o enfermedades cardíacas en estadios C y D.
- Pacientes que no cumplan los criterios para ser anestesiados con seguridad. Nos basamos en el sistema de clasificación que utiliza la *American Society of Anesthesiologist (ASA)* para determinar el riesgo anestésico de los pacientes. En caso de este ensayo fueron excluidos los pacientes pertenecientes a las clasificaciones ASA Clase IV y V.
 - *Clase IV*: Paciente con enfermedad sistémica grave e incapacitante, que constituye además amenaza constante para la vida. Por ejemplo: insuficiencias cardíaca, respiratoria y renal severas (descompensadas), diabetes mellitus descompensada con complicación, etc.
 - *Clase V*: Se trata del enfermo terminal o moribundo, cuya expectativa de vida no se espera sea mayor de 24-48 horas, con o sin tratamiento. Por ejemplo: traumatismos craneoencefálicos con edema cerebral severo, embolismo pulmonar masivo, etc.

Recogida de datos

De cada paciente participante en el estudio se recogieron los siguientes datos:

Datos relacionados con el paciente

- Edad: Edad de los pacientes cuantificada en años.
- Raza: Clasificación de las distintas razas según el listado oficial de la Federación Cinológica Internacional (FCI).
- Sexo: Clasificación de los pacientes entre hembra o machos.
- Estado reproductor: Clasificación de los pacientes entre enteros o esterilizados.
- Peso: Peso de los pacientes cuantificado en kilogramos (kg).
- Historia clínica previa: Antecedentes clínicos relevantes de los pacientes antes de entrar en el estudio.

- Fecha de la muerte: Día en el que se produjo el fallecimiento de cada paciente.
- Causa de la muerte: Causas, consecuentes o no del tumor, que pudieran ser la causa del fallecimiento.
- Estado de vacunación: Registro de la fecha de la última vacunación polivalente rutinaria que incluyera vacuna frente al adenovirus canino.
- Terapias oncológicas previas si las hubiera: Detallado de dosis, posología y duración del tratamiento oncológico previo al estudio.

Datos relacionados con el tumor

- Clasificación del tumor: Según los criterios establecidos por la WHO
- Localización del tumor: Localización anatómica del tumor al inicio del estudio
- Tamaño del tumor: Registro de las medidas de cada tumor, sea primario o secundario, en el caso de los pacientes con presencia de metástasis, desde el inicio del estudio hasta el final del este.
- Fecha de diagnóstico: Registro de la fecha de diagnóstico histopatológico del tumor
- Estadio clínico: Estadificación del tumor según el *sistema de estadificación TNM* propuesto por el *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* y el *Union for International Cancer Control (UICC)*.
- Tipo de aparición: Clasificación entre tumores primarios, recidivas o metástasis. Integración de datos en criterios TNM.
- Metástasis: Determinación de la existencia, número y localización de metástasis en el momento de inicio del estudio, así como durante todo el periodo de este. Integración de datos en criterios TNM.

Datos relacionados con el tratamiento de ICOCV15

- Duración del tratamiento: Cuantificado en días desde la administración de la primera hasta la última dosis.
- Número de dosis: Cuantificación de las dosis administradas a cada paciente.
- Medidas de las lesiones: Tomadas en centímetros (cm) mediante pie de rey en aquellas accesibles, y/o calculadas mediante las distintas técnicas de diagnóstico por imagen en las lesiones no accesibles.

Sedación y anestesia.

Los procedimientos que pudieran causar estrés o dolor al paciente, como la realización de tomografía computarizada (CT), toma de biopsia de la lesión e inoculación del virus, se realizaron bajo una sedación leve. El protocolo de sedación se basó en acepromacina

(0,03mg/kg) y metadona (0,1mg/kg). En aquellos casos en los que, por seguridad, el anestesista responsable del procedimiento lo viera necesario, se llevó a cabo la inducción anestésica del paciente con tiopental (dosis efecto) e isoflurano como agente inhalatorio de mantenimiento. Se confirmó la aceptación de los propietarios a través de la firma del Consentimiento informado de Anestesia (Anexo 3).

Pruebas de imagen.

El primer diagnóstico de las lesiones de los pacientes se llevó a cabo a través de pruebas de imagen para evaluar la extensión y localización de cada tumor. La prueba de imagen de elección fue una CT. Se realizó un estudio de cuerpo completo a cada paciente (*Tomógrafo axial computarizado modelo Toshiba Aquilion 16 cortes*) para evaluar las características de la lesión (tamaño, localización y grado de infiltración), así como la existencia de otras lesiones o metástasis. Este tipo de estudio se realizó previo a la primera dosis de tratamiento, al mes post administración y en cada administración de virus posterior. Se administró contraste intravenoso (IOHEXOL, Omnipaque a 2ml/kg) autorizado por los propietarios previamente (Consentimiento Informado de Contraste Intravenoso, Anexo 4) para mejorar el contraste entre tejidos adyacentes, y así tener una mejor visualización de las lesiones. En aquellos pacientes que no presentaban las lesiones en la superficie corporal, y por tanto la medición macroscópica con pie de rey (Figura 11) no era posible, la CT se complementó en algunos casos con un estudio ecográfico y/o radiológico, según la localización del tumor (Figura 12). De este modo, en este tipo de pacientes se consiguió realizar un seguimiento de la lesión sin recurrir a sedaciones frecuentes.

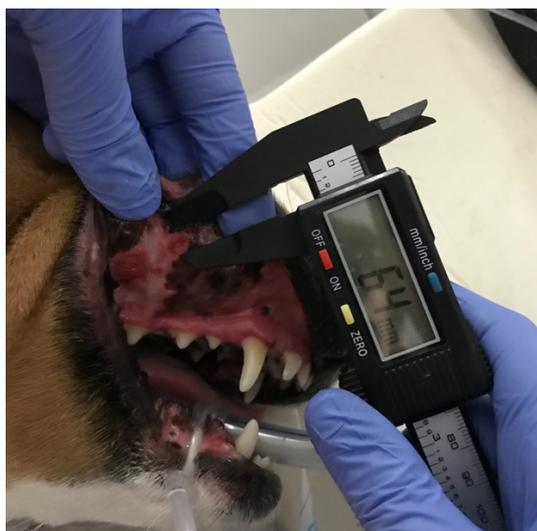


Figura 11. Medida directa de la lesión en el PSit04 con pie de rey.

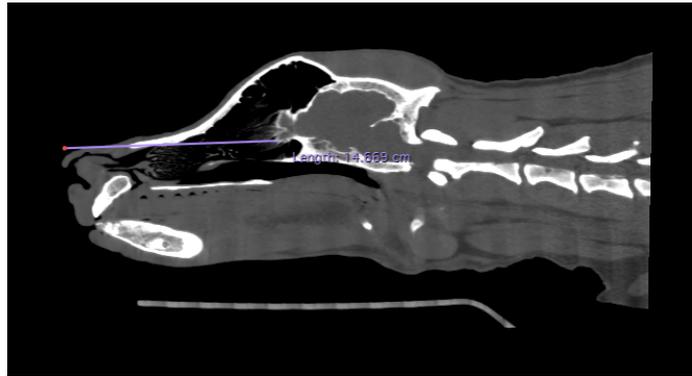


Figura 12. Medida plano dorsal mediante CT de la lesión en PSit06.

Toma de biopsias

Para valorar la naturaleza de las células tumorales y su grado de malignidad, se tomaron biopsias incisionales de los tumores. En el caso de los tumores accesibles se realizó mediante punch de 4mm y en aquellos que no eran accesibles se realizó de manera transtorácica /transabdominal con ayuda de aguja tru-cut de 18G, de forma ecoguiada (Figura 13). Se administró tratamiento analgésico, antiinflamatorio y antibiótico preventivo. La muestra obtenida se dividió en dos muestras semejantes para ser conservadas cada una de forma distinta en función de los estudios posteriores (formol y congelada en seco a -80°C). Los propietarios autorizaron la toma de la biopsia mediante la firma del Consentimiento Informado de Procedimiento Quirúrgico (Anexo 5). El diagnóstico histopatológico de las lesiones se realizó con las muestras conservadas en formol. Las muestras congeladas sirvieron para estudios moleculares posteriores, como la determinación de DNA viral mediante qPCR.

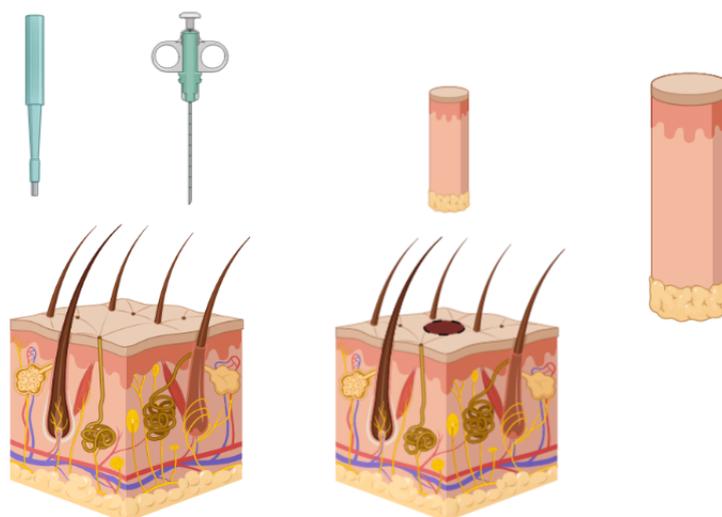


Figura 13. Esquema de toma de biopsia con punch o tru-cut.

Preparación y la administración del tratamiento.

El adenovirus oncolítico utilizado fue ICOCAV15, proporcionado por el Dr. Ramón Alemany del IDIBELL-ICO (Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge-Institut Català d'Oncologia). El adenovirus ICOCAV15 se mantiene alicuotado y criopreservado a una temperatura de -80°C . Se prepararon $500\mu\text{L}$ con 1×10^7 partículas virales (*viral particles*, vp) totales para cada dosis administrada a los pacientes, utilizando como diluyente suero salino fisiológico (*Physiological saline solution*, PSS) estéril. La preparación del tratamiento se llevó a cabo bajo los procedimientos de bioseguridad convenientes y en una cabina de seguridad biológica clase II (Bio II Advance Plus, Telstar).

La administración del virus se realizó inmediatamente tras su preparación, de manera intratumoral mediante la instilación con aguja de 23G en el tumor (Figura 14). Para una administración homogénea, el veterinario determinó de 3-5 cuadrantes en la superficie del tumor, según la extensión de este, y repartió la dosis entre ellos. En los casos donde el tumor no era accesible, la administración fue ecoguiada, y se inoculó el virus a lo largo de la línea de inyección a medida que iba retirando la aguja, asegurando una distribución extendida a lo largo del recorrido de la aguja.



Figura 14. Administración de tratamiento intratumoral con aguja de 23G.

Muestreo y seguimiento de los pacientes tras la administración del virus.

Tras la inoculación de ICOCAV15, los pacientes son monitorizados en el hospital veterinario durante las siguientes seis horas para la detección de cualquier efecto secundario. En el caso de que no se produzca ninguno, se les da el alta hospitalaria y vuelven con sus propietarios pasado el periodo de vigilancia. Los tiempos de muestreo se establecieron en base a un cronograma para los dos meses posteriores a la primera dosis (Tabla 5). A los dos meses, se evaluó la evolución del paciente y, de acuerdo con el

criterio del veterinario, se tomó una decisión sobre si administrar una siguiente dosis. En caso de tratar por segunda o tercera vez, todo el protocolo se inició desde el principio.

Días de revisión	Cuestionario de calidad de vida	Muestra de sangre para estudio celular	Muestra de sangre para hemograma y bioquímica	Tomografía Computarizada	Biopsia	Dosis de ICOCAV15
Pre-tratamiento	x	x	x	x	x	x
Día 7	x	x				
Día 14	x	x				
Día 21	x	x				
Día 28 (Primer mes)	x	x				
Día 35						
Día 42	x	x	x	x	x	
Día 49						
Día 56 (Segundo mes)	x	x	x	x	x	

Tabla 5. Cronograma del tratamiento con ICOCAV15, muestreo y pruebas de imagen.

Las primeras cuatro semanas tras la inoculación del virus, se realizó una evaluación clínica completa semanal por parte del veterinario, que además de la toma de muestra de sangre para análisis completo y estudio de poblaciones inmunes (Tabla 5), incluía un test de calidad de vida, adaptado de un estudio con pacientes oncológicos caninos (124), así como la medición macroscópica del tumor. Estas revisiones que fueron semanales durante el primer mes de tratamiento, quincenales durante el segundo mes, y bimensuales hasta completar un año de seguimiento, sirvieron para asegurar la detección temprana de efectos adversos, así como para evaluar la respuesta clínica del paciente según los criterios RECIST (*Response Evaluation Criteria In Solid Tumors*) (125).

La segunda dosis se administró, bajo el criterio del veterinario responsable y con el consentimiento del propietario, al menos dos meses después de la primera dosis (fijada inicialmente para el día 76), para evitar sedaciones frecuentes con los riesgos que ello conlleva, y poder tener un seguimiento de los posibles efectos secundarios tras la primera dosis. Después cada nueva dosis del virus, se iniciaba el protocolo de muestreo anteriormente descrito (Tabla 5).

Debido a la pandemia mundial de COVID19, el protocolo propuesto inicialmente no pudo ser seguido con exactitud, ya que tanto los propietarios como los responsables del estudio sufrieron periodos de cuarentena. El seguimiento de los pacientes también se vio afectado por las restricciones de movilidad; por lo que, el protocolo se tuvo que adaptar a cada situación particular, procurando mantener en la medida de lo posible, un seguimiento similar al estipulado inicialmente.

Método de eutanasia

Los pacientes que durante el estudio desarrollaron un empeoramiento grave del estado clínico inicial, fueron propuestos para salir del estudio siguiendo criterios médicos y teniendo en cuenta el bienestar animal. Puesto que los perros tratados eran animales de compañía, y no animales de experimentación, únicamente se realizó eutanasia con motivos humanitarios, y siempre siguiendo el criterio del veterinario oncólogo responsable. En ningún caso se realizó eutanasia para obtener exclusivamente un beneficio para el proyecto de investigación. Se solicitaron la autorización del propietario mediante un Consentimiento informado y firmado de Eutanasia (Anexo 6). El protocolo de eutanasia se realizó con tres fármacos intravenosos; primero un sedante (Dexmedetomidina 2mg/kg), tras este, un inductor de hipnosis (Propofol a dosis efecto) y por último un fármaco barbitúrico (Pentobarbital sódico 1ml/1,5kg).

Necropsia y toma de muestras *post-mortem*

Se propuso realizar una necropsia completa y sistemática con el fin de estudiar los efectos del tratamiento en los distintos órganos que pudieran verse afectados. Este procedimiento fue aceptado por los propietarios mediante una cláusula incluida en el Consentimiento de Eutanasia (Anexo 6). Durante la necropsia se procedió a la toma de muestra de las lesiones principales, secundarias y posibles metástasis que ya existieran previamente o que se hubieran generado durante el periodo del estudio. A su vez, se tomaron biopsias de hígado, por la naturaleza del virus al presentar tropismo hepático, y de bazo para evaluar diseminación viral. Se realizó un estudio histopatológico de todas las muestras obtenidas en la necropsia, para determinar el infiltrado inmune en el tumor, y la detección viral en distintos órganos.

SEGURIDAD Y EFICACIA

Para evaluar los posibles efectos adversos del tratamiento y cualquier posible deterioro en la salud los pacientes durante las revisiones, además de una exploración física general, se realizó un cuestionario de calidad de vida, analíticas sanguíneas completas y una evaluación específica de la lesión para poder determinar su posible respuesta al tratamiento.

Exploración física

Las exploraciones físicas generales se realizaron por parte del veterinario responsable y comprenden una auscultación completa cardíaca y pulmonar, evaluación del estado de hidratación, valoración del estado de las mucosas, así como el tiempo de relleno capilar, palpación abdominal completa en sus tres cuadrantes, toma de temperatura y peso.

Todos los datos obtenidos se registran en la historia clínica de cada paciente en el sistema de gestión qVet® de manera que todos los veterinarios colaboradores pueden acceder y aportar los datos necesarios de cada interacción con el paciente de manera centralizada.

Calidad de vida

En cada revisión se realiza una anamnesis del paciente por parte del veterinario, a través de su propietario, donde se le anima a relatar todos los acontecimientos relacionados con la vida de su mascota, aun pareciendo irrelevantes, y evalúa desde su juicio y en concordancia con el veterinario la evolución de los síntomas propios de la lesión. Para asegurar la adquisición de toda la información y poder determinar el bienestar del paciente de una manera objetiva, se realizó un test de calidad de vida (Tabla 6), adaptado del utilizado en un estudio previo de perros con cáncer (124). El cuestionario contiene 12 preguntas con 4 posibles respuestas puntuadas del 0-3, por lo que la puntuación máxima es 36, y puntuaciones por debajo de 20 son indicativas de mala calidad de vida. El cuestionario incluye preguntas sobre la sociabilización, autocuidado, capacidad para realizar acciones básicas por sí mismo, calidad del sueño, salud o aspectos gastrointestinales.

¿Cuánto crees que la enfermedad altera la calidad de vida de tu perro?			
Mucho (0)	Bastante (1)	Poco (2)	Casi nada (3)
¿Sigue realizando las actividades que le gustan (jugar, pasear...)?			
No (0)	Poca frecuencia (1)	Frecuentemente (2)	Como siempre (3)
¿Cómo está el estado de ánimo de tu perro?			
Alterado (0)	A veces alterado (1)	Un poco cambiado (2)	Normal (3)
¿Mantiene sus hábitos de limpieza de sí mismo?			
No (0)	Poca frecuencia (1)	Menos que antes (2)	Sí (3)
¿Con qué frecuencia crees que tu perro experimenta dolor?			
Todo el tiempo (0)	Frecuentemente (1)	Rara vez (2)	Nunca (3)
¿Tiene apetito tu mascota?			
No (0)	Forzado o alimentos que le gustan (1)	Menos del habitual (2)	Normal (3)
¿Se cansa tu mascota con facilidad?			
Sí (0)	Frecuentemente (1)	Rara vez (2)	No (3)
¿Cómo calificarías el descanso de tu perro?			
Muy malo (0)	Malo (1)	Casi normal (2)	Normal (3)
¿Con qué frecuencia vomita?			
Siempre (0)	Frecuentemente (1)	Rara vez (2)	Nunca (3)
¿Cómo calificarías la funcionalidad intestinal de tu perro?			
Muy malo (0)	Malo (1)	Casi normal (2)	Normal (3)
¿Tu perro es capaz de posicionarse él mismo para miccionar y defecar?			
Nunca (0)	Rara vez (1)	Frecuentemente (2)	Sí (3)
¿Cuánta atención le presta a la familia?			
Indiferente (0)	Poca atención (1)	Incremento de la atención (2)	No ha cambiado (3)

Tabla 6. Cuestionario de calidad de vida. Adaptada de (124)

Analíticas sanguíneas

Se obtuvo una muestra de sangre mediante la venopunción de la vena cefálica, safena o yugular con aguja de 23G para la realización de una analítica sanguínea completa previa al tratamiento para la evaluación del estado del paciente, así como a los tiempos pos-tratamiento anteriormente indicados. Las muestras sanguíneas fueron conservadas en tres tipos de tubos pretratados, uno de ellos con heparina, otro con EDTA y el tercero con citrato. Se realizaron estos análisis antes de cada nueva administración de ICOCV15, así como en cualquier momento del estudio en el que el paciente mostró un empeoramiento clínico. Estas analíticas completas incluían un hemograma, bioquímica

completa y pruebas de coagulación. Teniendo en cuenta el tropismo del virus y efectos secundarios reportados en un estudio similar como alteraciones en la coagulación o elevada activación del sistema inmune (117), los parámetros analizados fueron:

- Hemograma: hematíes ($\times 10^6/\mu\text{L}$), hematocrito (%), hemoglobina (g/dL), Volumen corpuscular medio (*mean corpuscular volumen*, M.C.V.; femtolitro, fl), Concentración de hemoglobina corpuscular media (*mean corpuscular hemoglobin concentration*, M.C.H.C; g/dl), Hemoglobina corpuscular media (*mean corpuscular hemoglobin*, M.C.H; picogramos, pg), distribución de tamaño de los glóbulos rojos (*red cell distribution width*, R.C.W; %), reticulocitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$), Reticulocitos inmaduros (%), leucocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$), neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$), linfocitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$), monocitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$), eosinófilos ($\times 10^6/\mu\text{L}$), basófilos ($\times 10^6/\mu\text{L}$), plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$), plaquetocrito (%), Volumen plaquetar medio, (*mean platelets volume*, M.P.V.; fl), distribución de tamaño plaquetar, (*platelets distribution width*, P.D.W.; %)
- Iones: magnesio (mg/dL), sodio (mEq/L), potasio (mEq/L), cloro (mEq/L), calcio (mg/dL), fósforo inorgánico (mg/dL)
- Glucosa basal (mg/dL)
- Parámetros renales: urea (mg/dL), BUN (mg/dL), creatinina (mg/dL)
- Proteínas: proteínas totales (g/dL), albúmina (g/dL), globulinas (g/dL), índice albumina/globulinas
- Parámetros hepáticos: Fosfatasa Alcalina (U/L) y GOT (AST) (U/L) y GPT (ALT) (U/L).
- Parámetros de coagulación: Tiempo de Protrombina (s), Tiempo de Tromboplastina parcial activada (s) y Fibrinógeno (mg/dL).

Respuesta clínica al tratamiento con ICOCV15

La respuesta al tratamiento se valoró siguiendo los criterios *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors* (RECIST), (125) tomando como medida inicial la medición de la lesión principal previamente a la inoculación del virus. Estos criterios definen distintos grados de respuesta clínica por parte de los tumores sólidos:

- *Respuesta Completa (complete response, CR)*: desaparición de todas las lesiones principales y linfonodos con <10mm en su axis menor.
- *Respuesta parcial (partial response, PR)*: reducción de al menos el 30% en

la suma de los diámetros de la lesión principal frente a la medida de inicio del estudio.

- *Enfermedad progresiva (progressive disease, PD)*: aparición de una o más nuevas lesiones o un aumento de al menos el 20% del tamaño de la lesión principal frente a la medida más pequeña durante el estudio.
- *Enfermedad estable (stable disease, SD)*: menos del 30% de reducción o menos del 20% de aumento en la suma de los diámetros de la lesión principal frente a la medida más pequeña tomada en el estudio.

La evaluación de la eficacia del tratamiento con ICOCV15 estará determinada por esta clasificación, así como por la duración de la respuesta.

EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE DNA DE ICOCV15

Las biopsias obtenidas en las revisiones, así como en las necropsias, fueron criopreservadas en seco a una temperatura de -80°C hasta que fueron procesadas. Cada muestra fue disgregada en porciones de entre 10 y 30mg de las cuales se extrajo DNA con un kit comercial específico para aislar DNA de tejidos (E.Z.N.A.® Tissue DNA kit; Omega biotech, Norcross, GA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificó y analizó la pureza del DNA (A260/280 y A260/230) con un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Se realizó una curva estándar con diluciones de ICOCV15 desde 0.4×10^6 partículas virales (vp)/pocillo hasta 4 vp/pocillo, utilizando sangre de perro como diluyente. Las muestras triplicadas de DNA purificado fueron analizadas por la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (*Polymerase Chain Reaction-Real Time*, PCR-RT) usando el QuantStudio 3 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). Usamos el Premix Ex Taq (Clontech Laboratories Inc, Mountain View, CA, USA), primer forward (0.5 $\mu\text{mol/L}$) 5'-TGTGGCCTGTGTGATTCCT-3', primer reverse (0.5 $\mu\text{mol/L}$) 5'-CCAGAATCAGCCTCAGTGCTC-3', y 10 pmol de Taqman probe FAM-CTCGAATCAGTGTCAGGCTCCGCA-TAMRA para 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 min a 60 °C. Analizamos los datos obtenidos con el software QuantStudio 3 (Applied Biosystem). El número de Ct detectado en cada pocillo fue extrapolado a la curva estándar para cuantificar el número de copias de ICOCV15 en las muestras, y a continuación, se calculó la media de los triplicados.

CITOMETRÍA DE FLUJO

De las muestras obtenidas de sangre periférica, una parte se centrifugó y se criopreservaron las células con suero fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*, FBS) y dimetilsulfóxido (DMSO) para el posterior análisis del fenotipado celular en sangre

periférica a lo largo del estudio. Mantuvimos las muestras criopreservadas en nitrógeno líquido a una temperatura de -196°C hasta su análisis por citometría de flujo.

La citometría de flujo se realizó en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad Autónoma de Barcelona, gracias a una colaboración con el Dr. Josep Pastor. Las muestras fueron descongeladas progresivamente en un baño maría a una temperatura de 37°C, luego fueron centrifugadas y resuspendidas en solución salina tampón fosfato (*Phosphate Buffered Saline*, PBS) con FBS al 2%. Se añadió 59µl de la suspensión celular a 250µl de PBS con FBS al 2% y fueron incubadas a temperatura ambiente durante 30 minutos con el panel del anticuerpo seleccionado, a continuación, se lavaron dos veces, se resuspendieron en PBS y se analizaron. La adquisición de datos se realizó con Cytoflex S (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) y Cytoexpert software version 2.4.028 (Beckman Coulter). Se analizaron un total de 20.000 eventos por cada tubo. Se utilizaron 5 µg/tubo de yoduro de propidio para excluir las células muertas, y la población de células vivas fueron detectadas por el *side scatter cytogram* versus el *forward scatter cytogram*. Los anticuerpos utilizados fueron: CD21-PE (Bio-Rad, Hercules, CA, USA, clone CA2.1D6) para detectar células B; CD5-FITC (Bio-Rad, clone YKIX322.3) para detectar linfocitos B (colaboradores y citotóxicos); CD56-APC (Sysmex, Barcelona, Spain, clone LT56) para detectar células *natural killers* (NKC), CD8-PE (Bio Rad, clone YCATE55.9) para detectar linfocitos T citotóxicos y CD4-FITC (Bio-Rad, clone YKIX302.9) para detectar linfocitos T colaboradores, CD14-PE (Bio-rad, clone Tük4) para detectar monocitos y macrófagos, y MHC-FITC de clase II (Bio-Rad, clone YKIX334.2) para detectar células presentadoras de antígenos (incluidas células B) y también linfocitos T activados.

INMUNOHISTOQUÍMICA

Para determinar el infiltrado inmune en los tejidos se realizó un estudio de inmunohistoquímica (IHQ) de todas las muestras de tejido tumoral obtenidas. Se analizaron de esta manera las lesiones tumorales de cada paciente antes y después de cada tratamiento, así como las metástasis si existieran, detectadas durante la necropsia. Las biopsias se fijaron con formol al 10% en proporción 1:10 con el fin de conservar las estructuras. El proceso de fijación debe durar entre 24-48 horas. A continuación, las muestras se tallan y se incluyen en los *cassettes*. Con el fin de endurecerlas, se procede a la inclusión de la muestra en parafina, para lo que previamente se deshidratan en una batería creciente de alcoholes (etanol 70% 1 × 5 min, etanol 96% 1 × 5 min, etanol 100% 2 × 5 min, xylol 2 × 5 min). Una vez obtenidos los bloques sólidos de parafina, se procede al corte con micrótopo a unas 3µm y montaje de las preparaciones en los portaobjetos.

El protocolo de inmunohistoquímica es similar para todos los anticuerpos estudiados. Las muestras primero deben desparafinarse durante 30 minutos en una estufa a 58-60°C y a continuación, se llevan a una batería de alcoholes decrecientes para hidratarlas

(xylol 2 × 5 min, etanol 100% 2 × 5 min, etanol 96% 1 × 5 min, etanol 70% 1 × 5 min). Tras esto se lleva a la ebullición durante 3 minutos en un buffer citrato para desenmascarar el antígeno. El siguiente paso consiste en dos lavados en H₂O₂ al 6%, de 10 y 20 minutos respectivamente, para inhibir la peroxidasa endógena seguido de un lavado de 15 minutos en PBS + tritón 0,1%. Para terminar, incubamos 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda con la solución de bloqueo Normal Horse Serum (R.T.U Vectastain, Vector Laboratories) y por último, transcurrido el tiempo, preparamos el anticuerpo primario (anti-CD3 (UCHT1 3 mg/mL; Dako, Santa Clara, CA, USA); anti-CD4 (OTI10B5 a 2 µg/mL; Origene, Rockville, MD, USA); anti-S100A9 + calprotectin (MAC387 1 µg/mL; Abcam, Cambridge, UK); polyclonal anti-CD20 (0.17 µg/mL; Invitrogen, Waltham, MA, USA); polyclonal anti-Ad5 (1.25 µg/mL, Abcam); anti-CD31 (JC70A 1:2, Dako)) en PBS + Tritón 0,1% + BSA 0,2% e incubamos *overnight* a 4°C en cámara húmeda.

Al día siguiente, tras atemperar las muestras durante 30 minutos a temperatura ambiente se realizan 3 lavados de 5 minutos con PBS + Tritón 0,1%. A continuación, se incuba con el anticuerpo secundario biotinilado Anti Rabbit/Mouse IgG (R.T.U. Vectastain) en cámara húmeda durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo, volvemos a realizar tres lavados de 5 minutos en PBS + Tritón 0,1% y añadimos el reactivo ABC (R.T.U. Vectastain) durante 30 minutos en cámara húmeda. Realizamos otro lavado en PBS + Tritón 0,1% y procedemos a revelar con DAB (Peroxidase Substrate, Vector). El tiempo de revelado con la DAB depende del anticuerpo, así que se estableció un tiempo distinto para cada uno de ellos, utilizando tejidos como controles positivos de marcaje específico. Para terminar, una vez reveladas, realizamos una contratinción con hematoxilina (Harris Hematoxylin solution, PanReac AppliChem, Milan, Italy) y llevamos las muestras a una batería de alcoholes ascendentes para deshidratarlas. Por último, montamos los portaobjetos con cubreobjetos añadiendo medio de dibutilftalato poliestreno xileno (DPX) y dejamos secar *overnight* hasta su almacenamiento.

La señal de positividad, indicando presencia de células inmunes, fue cuantificada siguiendo un proceso cualitativo por un técnico experimentado. Se evaluó la muestra completa utilizando un escáner de portaobjetos NanoZoomer® en el Instituto de Salud Carlos III, para escanear un rango de tamaño de muestras entre 2,5x0,9 y 23x12 mm. Se establecieron los siguientes niveles de marcaje inmune: Negativo (0% de marcaje), Positivo leve (1-25% de marcaje), Positivo moderado (26-55% de marcaje) y Positivo alto (marcaje >56%).

ANTICUERPOS ANTI-CAV2

Se procesó parte de la sangre almacenada en los tubos de heparina para el estudio de anticuerpos anti-CAV2, tanto de las muestras de sangre periférica obtenidas en el

momento previo al tratamiento, así como en las revisiones durante el mismo, Los tubos se centrifugaron a 200rpm durante 10 min para la obtención de plasma. Y a continuación, almacenamos las muestras de plasma a -80 °C hasta el análisis.

Los anticuerpos contra adenovirus canino (α -CAV2) se determinaron mediante un ensayo de ELISA en fase sólida (Canine VacciCheck Antibody Test Kit; Biogal Galed Labs 2021), siguiendo las instrucciones del fabricante. El resultado se obtiene en función de la intensidad de color que tienen los puntos en el peine del kit (Figura 15). Estos peines, se escanearon para digitalizar la imagen, y poder así cuantificar la cantidad de anticuerpos utilizando el programa de análisis de imagen ImageJ (126).

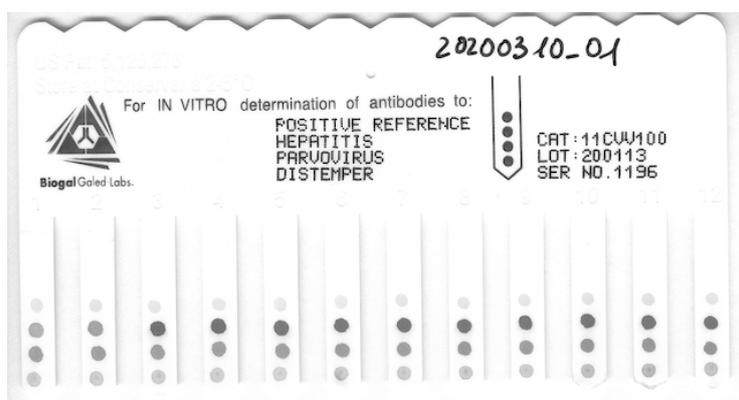


Figura 15. Peine del ELISA en fase sólida, utilizado para la determinación de anticuerpos anti-CAV. Como se indica en la parte central del peine, cada punto de cada una de las tiras corresponde a un marcador cualitativo de presencia de anticuerpos frente a, de arriba abajo y precedidos por la señal de control positivo, adenovirus (causante de hepatitis), parvovirus (causante de la parvovirosis) y distemper (causante del moquillo canino).

En cada tira individual del peine, se obtiene una marca colorimétrica de control para asegurar que el ELISA se ha desarrollado de la manera correcta. Utilizando el valor cuantitativo que el programa otorgó al punto de control y al punto del anticuerpo anti-CAV, se restó el valor del control al de la muestra, y se calcularon las unidades arbitrarias de la siguiente manera (intensidad de la muestra - intensidad media del fondo de la muestra) - (intensidad de referencia positiva - intensidad media del fondo del punto de referencia positiva).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se graficaron y analizaron los datos con GraphPad Prism (GraphPad Software), y luego se realizaron comparaciones entre las variables cuantitativas con una prueba t de Student para muestras con una distribución normal (* $p < 0,05$).

RESULTADOS

RESULTADOS

PACIENTES DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

El estudio incluyó a ocho pacientes oncológicos caninos, que cumplieron los criterios de inclusión. No hubo ninguna exclusión durante el estudio, por lo que los 8 perros recibieron la administración de ICOCV15 intratumoral. Tres pacientes (PSit02, PSit04, PSit08) abandonaron el estudio después de haber sido tratados por petición de los propietarios. Se incluyeron varias razas de perros: *schnauzer*, *labrador retriever*, *golden retriever*, *pastor alemán*, *cocker spaniel* y mestizos; con edades comprendidas entre los 7 y los 13 años (mediana de 11 años), incluyendo hembras y machos en distintos estados de reproducción (Tabla 7).

Seis de los ocho perros incluidos en el estudio, estaban vacunados frente al adenovirus canino (CAV) con la dosis anual recomendada, mientras que un perro no realizaba la pauta de vacunación anual recomendada y otro no se había vacunado desde las dosis de cachorro (Tabla 7).

Paciente	Raza	Edad (años)	Sexo	Estado reproductor	Estado de vacunación
PSit01	Schnauzer miniatura	13	Hembra	Castrada	Correcto
PSit02	Golden Retriever	11	Macho	Entero	Correcto
PSit04	Mestizo	7	Hembra	Entera	No vacunada desde primera dosis
PSit05	Pastor Alemán	10	Hembra	Castrada	Correcto
PSit06	Mestizo	11	Macho	Entero	No vacunado correctamente
PSit07	Labrador Retriever	13	Hembra	Castrada	Correcto
PSit08	Mestizo	10	Hembra	Castrada	Correcto
PSit09	Cocker Spaniel	13	Hembra	Castrada	Correcto

Tabla 7. Características de los pacientes incluidos en el estudio.

Seis de los perros oncológicos fueron diagnosticados de carcinoma (PSit02, PSit04, PSit05, PSit07, PSit08, PSit09), y los dos restantes de adenocarcinomas (PSit01 y PSit06). Dentro de los carcinomas, se diagnosticaron dos pacientes con carcinoma de células escamosas en la región del plano nasal (PSit02 y PSit07 (Figura 16)) y otro en la región gingival de la maxila (PSit07), dos pacientes con carcinoma pulmonar (PSit05 y PSit08) (Figura 17) y uno de ellos con una metástasis de carcinoma de células escamosas mamario en la pared costal (PSit09). Los dos adenocarcinomas fueron diagnosticados como adenocarcinoma de sacos anales (PSit01) y un adenocarcinoma nasal (PSit06) (Tabla 8).

El paciente PSit01 diagnosticados de AGASACA presentaba metástasis múltiples en hígado, pulmón y linfonodos regionales al inicio de tratamiento. Además, en el caso del paciente PSit09 la lesión objetivo que se trató corresponde a una metástasis en la región costal derivada de un carcinoma mamario operado en otro centro unos años atrás del cuál no se tiene información histológica y que ya provocó un osteosarcoma en el húmero (Tabla 8). Los diagnósticos histopatológicos de las lesiones tumorales de cada paciente se realizaron mediante muestras tomadas por biopsias incisionales excepto en el caso del paciente PSit05 que se realizó mediante punción por aguja fina.

Actualmente dos pacientes se mantienen con vida, uno de ellos, el paciente PSit04, se trató desde noviembre de 2019 hasta mayo de 2020 y recibió su última revisión completa en julio de 2020 donde se excluyó del estudio y se continuó con un seguimiento telefónico, y otro, el paciente PSit06, se trató desde diciembre de 2019 hasta agosto de 2020, donde recibió la última dosis de tratamiento, siendo su última revisión completa en diciembre de 2021 y manteniendo un seguimiento telefónico hasta febrero del 2023 (Tabla 8).

Se inocularon 2,1 dosis de ICOCAV15 en promedio por paciente, con un máximo de 3 dosis en dos perros, y una única dosis en un perro ya que los propietarios decidieron aplicarle la eutanasia humanitaria a los 21 días de la primera dosis (Tabla 8).

Paciente	Diagnóstico	Metástasis inicial	Dosis de ICOCAV15	Seguimiento (días)	Supervivencia (días)
PSit01	Adenocarcinoma de Glándula Apocrina del Saco Anal	Pulmón, Hígado, Linfonodos	2	282	282
PSit02	Carcinoma de Células Escamosas (plano nasal)	No	2	221	332
PSit04	Carcinoma de Células Escamosas (oral)	No	3	266	Vive (3 años y 3 meses)
PSit05	Carcinoma Pulmonar	No	2	332	332
PSit06	Adenocarcinoma Nasal	No	3	730	Vive (3 años 2 meses)
PSit07	Carcinoma de Células Escamosas (plano nasal)	No	1	21	21
PSit08	Carcinoma Pulmonar	No	2	177	319
PSit09	Carcinoma de Células Escamosas (pared costal)	No	2	389	389

Tabla 8. Características de los pacientes, relacionadas con el diagnóstico, tratamiento y supervivencia.



Figura 16. Paciente PSit07. Se muestra lesión causada por carcinoma de células escamosas en la región de la trufa con signos erosivos y proliferativos, y un aumento de la inflamación de toda la región.

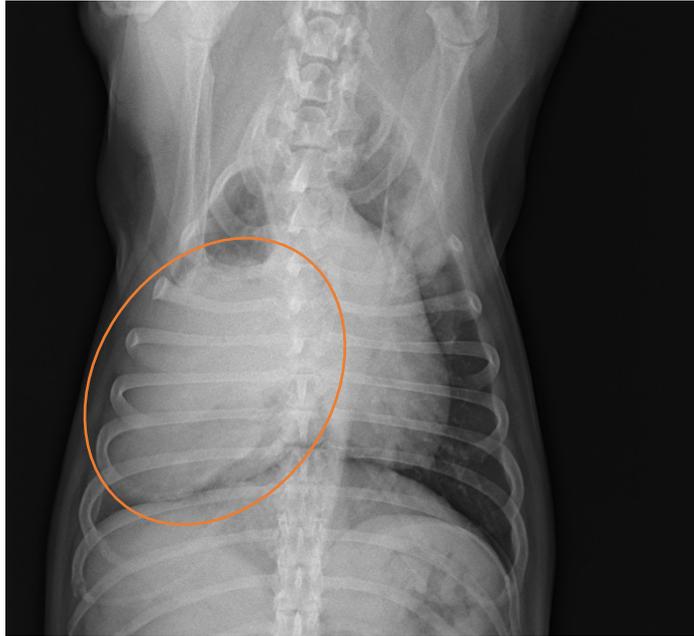


Figura 17. Paciente PSit08. Se muestra una radiografía torácica en proyección ventrodorsal en la que se observa un efecto masa de densidad media (carcinoma pulmonar) que llega a desplazar ligeramente al corazón.

Tres de los perros recibieron ICOCAV15 como primera línea de tratamiento, ya que sus propietarios rechazaron otras terapias disponibles. La paciente PSit04 rechazó el tratamiento quirúrgico, siendo este el de primera elección para los SCC por considerarlo demasiado agresivo y se mantuvo en monoterapia con ICOCAV15 desde el inicio del estudio sin necesidad de ningún otro fármaco. Tras abandonar el estudio fue tratada con electroquimioterapia en otro centro.

El paciente PSit06, con adenocarcinoma nasal, no pudo acceder a la terapia de elección, la radioterapia, por inexistente disponibilidad geográfica y se mantuvo en monoterapia durante todo el estudio con ICOCAV 15 sin necesidad de otros fármacos.

La paciente PSit09 optó por comenzar el tratamiento como primera elección. Sólo se añadió otro fármaco ya que se mantuvo con tratamiento analgésico (tramadol 2 mg/kg dos veces al día) para controlar el dolor causado por una nueva metástasis en la pelvis, que apareció poco tiempo después de la primera dosis de ICOCAV15.

Los 5 restantes habían sido tratados con quimioterapia como primera línea de tratamiento, y cuando se consideró que había fracaso terapéutico, se incluyeron en el estudio para la administración de ICOCAV15.

Los pacientes PSit01, PSit02, PSit07 y PSit08 rechazaron el tratamiento quimioterápico (inhibidor de tirosina quinasa (ITK) toceranib fosfato) tras no ver resultados y alguno de ellos (PSit02 y PSit07) por presentar sintomatología gastrointestinal de manera frecuente asociada al tratamiento. Comenzaron en monoterapia con ICOCAV15. Por problemas articulares, al paciente PSit08 se le administró de manera puntual meloxicam a dosis de 0,1mg/kg día. Y al paciente PSit02, también por problemas articulares, se le administró de manera puntual robenacoxib a dosis de 2mg/kg día. El paciente PSit05 fue tratado previamente con ciclofosfamida y también de manera puntual recibió dosis de meloxicam a 0,5mg/kg en caso de cojeras causadas por artrosis. Ninguno de estos cinco perros volvió a los tratamientos anteriores después de ser incluido en el estudio, y se mantuvieron con ICOCAV15 en monoterapia (Tabla 9).

Pacientes	Tratamiento	Dosis*	Tiempo en tratamiento previo al estudio
PSit01	ITK toceranib fosfato	3,25mg/kg/48h	2 meses
PSit02	ITK toceranib fosfato	3,25mg/kg/48h	12 meses
PSit07	ITK toceranib fosfato	3,25mg/kg/48h	4 meses
PSit08	ITK toceranib fosfato	3,25mg/kg/48h	1 mes
PSit05	Ciclofosfamida	50mg/m2/día	6 meses

Tabla 9. Relación de pacientes en tratamiento quimioterápico previo al estudio. *Dosis inicial, con posibles adaptaciones por parte del veterinario en cada situación individual.

EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD DEL TRATAMIENTO INTRATUMORAL CON ICOCAV15

Se utilizaron los criterios de Terminología Común Veterinaria (*Common Terminology Criteria for Adverse Events*; CTCAE) del Grupo de Oncología Cooperativa (*Veterinary Cooperative Oncology Group*; VCOG) para la evaluación de la toxicidad de ICOCAV15 (127). Durante el seguimiento, no se detectaron anomalías en la exploración física por parte del veterinario en ninguno de los participantes. Durante las revisiones de seguimiento de los pacientes, se analizó sangre periférica para evaluar tanto los componentes celulares de la sangre, como los parámetros bioquímicos. No se observaron cambios generalizados ni con relevancia clínica en ninguno de los parámetros analizados en la sangre periférica; sin embargo, hubo cambios particulares en algunos de los perros tratados.

El hematocrito de todos los pacientes se mantuvo estable durante todo el tratamiento, con algunas variaciones sin significación clínica leves a excepción del paciente PSit09 que, en el análisis de la última revisión mostró un descenso significativo en el valor (Figura 18).

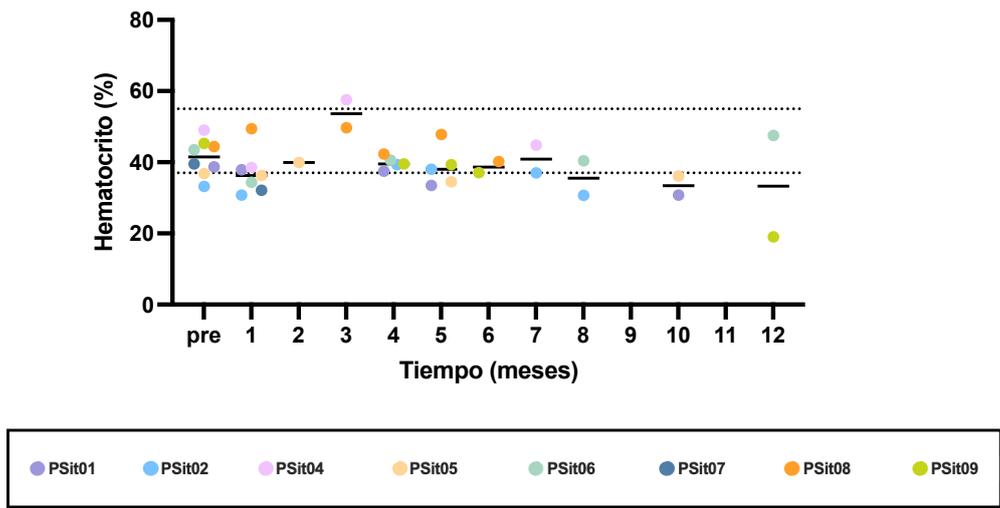


Figura 18. Análisis de hematocrito desde el inicio (pre) y durante el primer año de tratamiento. Se muestran los resultados de cada paciente mediante la guía de colores y la media (-). Líneas discontinuas: límite del rango fisiológico.

La línea plaquetar tampoco mostró cambios significativos generales en los pacientes durante el tratamiento de ICOCAV15. El paciente PSit01 mostró valores superiores a los rangos fisiológicos un mes después de la primera dosis para luego normalizarse durante el resto del tiempo de tratamiento. Uno de los pacientes (PSit04) presentó valores inferiores al rango fisiológico a los tres meses de la primera dosis no asociado a sangrados, hematomas o sintomatología similar (Figura 19).

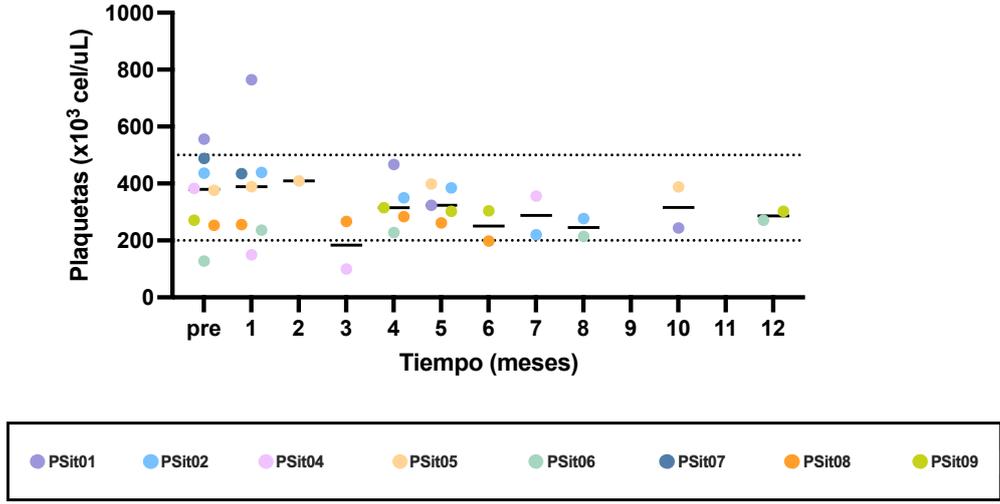


Figura 19. Análisis de plaquetas desde el inicio (pre) y durante el primer año de tratamiento. Se muestran los resultados de cada paciente mediante la guía de colores y la media (-). Líneas discontinuas: límite del rango fisiológico.

Los leucocitos permanecieron estables, dentro del rango fisiológico, durante todo el tratamiento en los pacientes PSit01, PSit02, PSit04, PSit06 y PSit07. El perro PSit05 mantuvo desde su inclusión en el estudio niveles de leucocitos algo superiores al rango establecido como fisiológico normal. Aumentaron después de la primera dosis de tratamiento en el paciente PSit08 (carcinoma pulmonar) (Figura 20). PSit09 mostró estabilidad durante todo el tratamiento a excepción del último control donde los leucocitos aumentaron por encima del rango fisiológico.

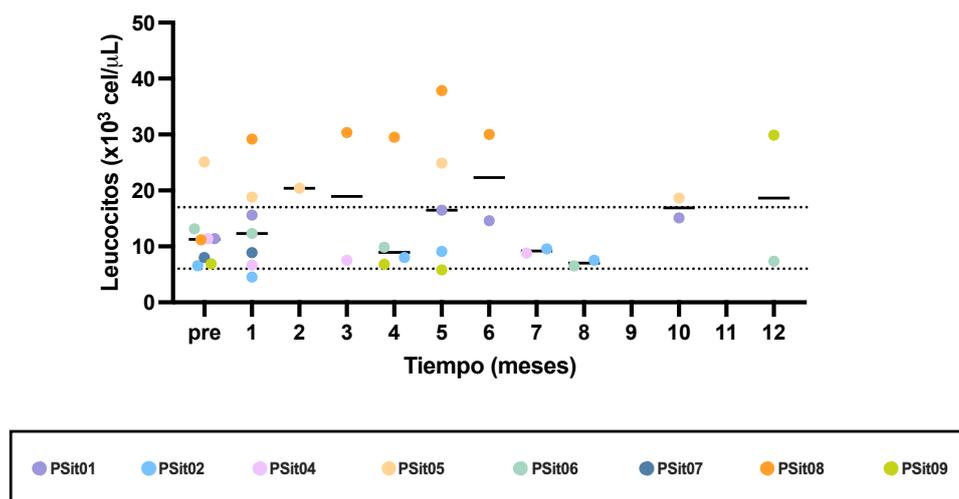


Figura 20. Análisis de leucocitos desde el inicio (pre) y durante el primer año de tratamiento. Se muestran los resultados de cada paciente mediante la guía de colores y la media (-). Líneas discontinuas: límite del rango fisiológico.

En todos los casos anteriormente descritos donde se observó un aumento de la población leucocitaria fueron los neutrófilos los que se mostraron por encima de su valor fisiológico.

Con relación a los parámetros bioquímicos, no se observaron cambios generalizados en los pacientes tras la administración de ICOCAV15, pero sí algunas variaciones individuales en alguno de los perros tratados. Para evaluar la función hepática, se cuantificaron las enzimas hepáticas, la albúmina y los tiempos de coagulación (Figura 21-25). El paciente PSit01 (AGASACA) con metástasis en hígado desde el comienzo del estudio mostró un aumento a los 5 meses de la primera dosis de la enzima aspartato aminotransferasa (AST) acompañada de la alanina aminotransferasa (ALT) (Figura 21-22). El paciente PSit02 (carcinoma de células escamosas plano nasal) presentó un aumento leve por encima de los valores fisiológicos de la ALT como parámetro aislado dentro de los de funcionalidad hepática desde el cuarto hasta el octavo mes del tratamiento (Figura 22). El paciente PSit05 también registró un aumento de la ALT en la última revisión antes de dejar el estudio (Figura 22). En cuanto a la valoración de la producción hepática, los valores de albúmina solo se vieron reducidos muy levemente

en el paciente PSit02 (Figura 23). Y en cuanto a los tiempos de coagulación, los pacientes PSit01, PSit02, PSit05, PSit06, PSit07 y PSit08 mostraron tiempos alterados, pero con una clasificación leve sin significación clínica (Figura 24 - 25). En el caso del paciente PSit04 si mostró un aumento del tiempo de protrombina moderado no asociado a sangrado en el primer mes de tratamiento (Figura 24).

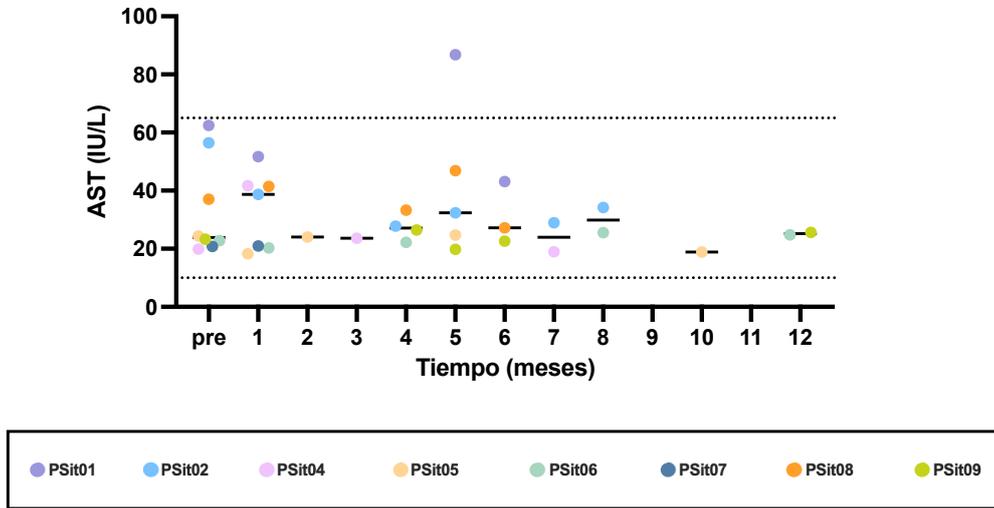


Figura 21. Análisis de la enzima aspartato aminotransferasa (AST) desde el inicio (pre) y durante el primer año de tratamiento. Se muestran los resultados de cada paciente mediante la guía de colores y la media (-). Líneas discontinuas: límite del rango fisiológico.

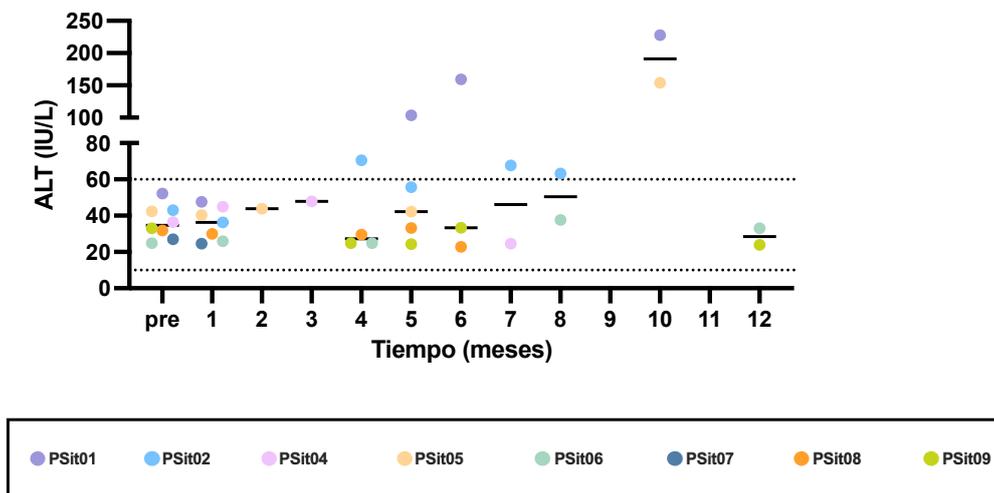


Figura 22. Análisis de la enzima alanina aminotransferasa (ALT) desde el inicio (pre) y durante el primer año de tratamiento. Se muestran los resultados de cada paciente mediante la guía de colores y la media (-). Líneas discontinuas: límite del rango fisiológico.

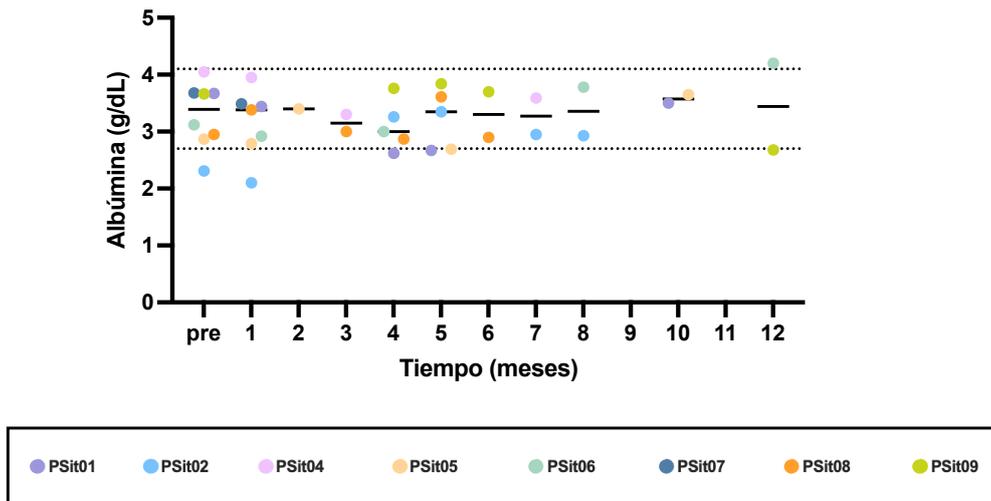


Figura 23. Análisis de albúmina desde el inicio (pre) y durante el primer año de tratamiento. Se muestran los resultados de cada paciente mediante la guía de colores y la media (-). Líneas discontinuas: límite del rango fisiológico.

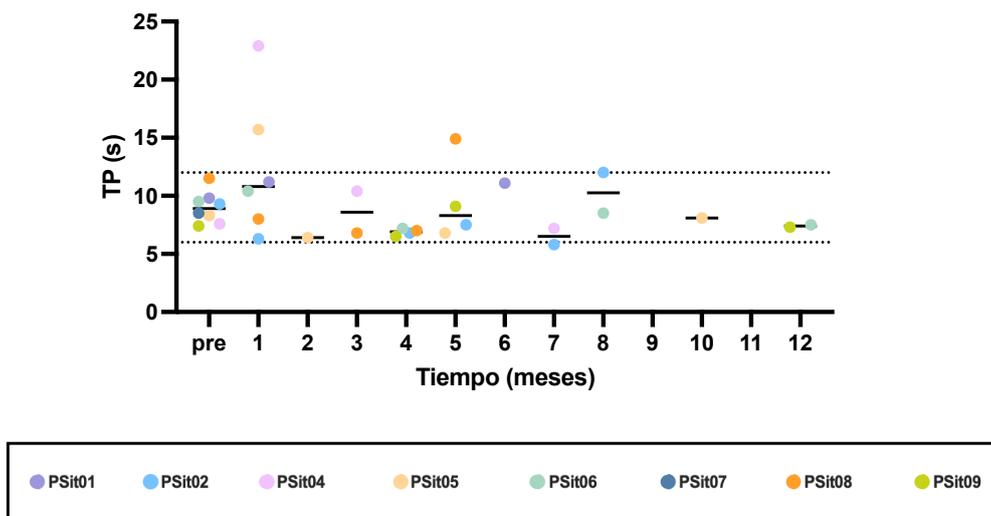


Figura 24. Análisis de tiempo de protrombina (TP) desde el inicio (pre) y durante el primer año de tratamiento. Se muestran los resultados de cada paciente mediante la guía de colores y la media (-). Líneas discontinuas: límite del rango fisiológico.

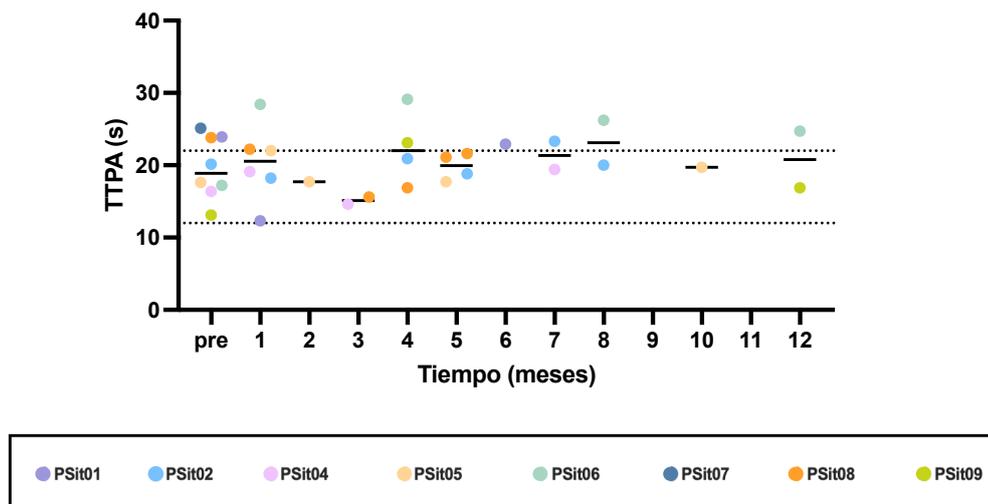


Figura 25. Análisis de tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) desde el inicio (pre) y durante el primer año de tratamiento. Se muestran los resultados de cada paciente mediante la guía de colores y la media (-). Líneas discontinuas: límite del rango fisiológico.

Para evaluar la función renal, se evaluó la creatinina en sangre periférica. En los pacientes PSit01 (AGASACA) y PSit09 (SCC metastásico en la pared costal), se detectó un aumento de la creatinina 9,5 y 12 meses después de la primera dosis, respectivamente (Figura 26).

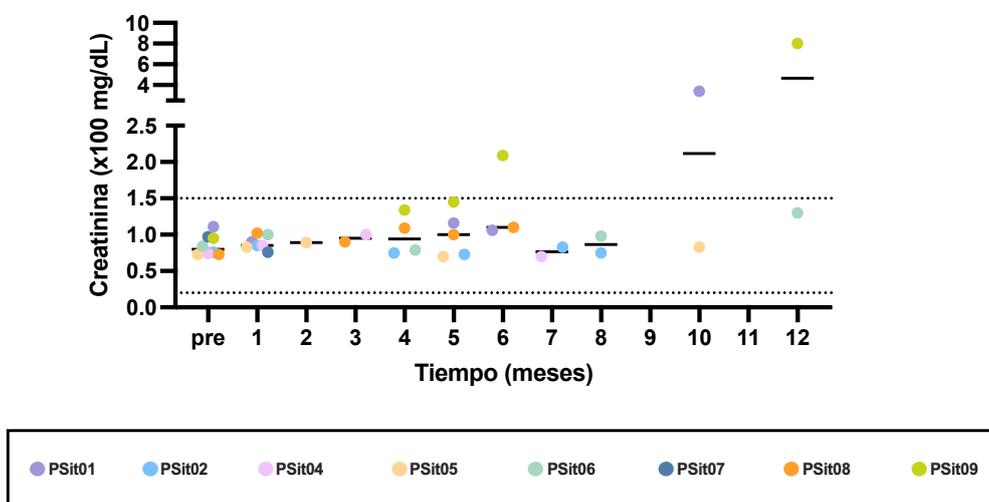


Figura 26. Análisis de creatinina desde el inicio (pre) y durante el primer año de tratamiento. Se muestran los resultados de cada paciente mediante la guía de colores y la media (-). Líneas discontinuas: límite del rango fisiológico.

El tiempo de coagulación (Figura 24 - 25), además de como parámetro hepático, también se tuvo en cuenta para la valoración propiamente dicha de la coagulación, junto a las plaquetas (Figura 19).

Los efectos adversos observados mediante las analíticas sanguíneas se clasificaron en función de su gravedad (Tabla 10) (127). La alteración más frecuente (75% de los pacientes) fue un aumento del TTPA, aunque en todos los casos menor de 1,5 veces, una alteración de grado 1 y sin relevancia clínica que tampoco mostró sintomatología relacionada. Las siguientes más frecuentes fueron las leucocitosis, la ALT aumentada y el aumento del TP. En el caso de la leucocitosis causada por neutrofilia, se considera de grado 1 y sin necesidad de intervención clínica. La ALT si se vio aumentada en dos de los pacientes con significancia obteniendo un grado 2 de gravedad por superar más de 1,5 veces el valor del rango fisiológico superior. También entre los pacientes que mostraron un aumento del tiempo de la protrombina, uno de ellos obtuvo la gravedad 2 al superar 1,5 veces el tiempo correspondiente al rango superior establecido, aunque tampoco en este caso se acompañó de sangrado, hematomas o cualquier sintomatología que pudiera asociarse. Menos prevalente con un 25% pero más graves fueron los aumentos de creatinina en dos de los pacientes obteniendo una clasificación de grado 3 por aumentar hasta 3 veces el valor del rango superior fisiológico y más de tres veces en el caso de grado 4.

Dos pacientes mostraron alteraciones leves de anemia y trombocitosis que no fueron clasificadas por gravedad al no encontrarse en los parámetros del estudio de la toxicidad de tratamientos.

	N(%)	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
Hemograma					
Anemia	1(12,5)		-	-	-
Trombocitosis	1(12,5)		-	-	-
Trombocitopenia	2 (25)	2	-	-	-
Leucocitosis	3 (37,5)	3	-	-	-
Bioquímica					
AST aumentada	1(12,5)	1	-	-	-
ALT aumentada	3 (37,5)	1	2	-	-
Hipoalbuminemia	1(12,5)	1	-	-	-
TP aumentado	3 (37,5)	2	1	-	-
TTPA aumentado	6 (75)	6	-	-	-
Creatinina aumentada	2 (25)	-	-	1	1

Tabla 10. Efectos secundarios hematológicos

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE VIDA DURANTE EL TRATAMIENTO

La calidad de vida de los perros tratados se evaluó con los datos obtenidos de la anamnesis en relación con la evolución de la sintomatología asociada al tumor, y también analizando los resultados obtenidos en el cuestionario, realizado

mensualmente. Los pacientes PSit02 con SCC en el plano nasal y PSit06 con adenocarcinoma en la cavidad nasal presentaban muchas molestias al respirar, ronquidos y estornudos frecuentes por el aumento de las secreciones nasales, epistaxis, y la propia edematización de la zona que ocluía la vía aérea. Ambos experimentaron una disminución, tanto de secreciones como de sangrados, lo que mejoro su capacidad respiratoria, desde que comenzaron el tratamiento con ICOCAV15.

El cuestionario, para establecer el comportamiento y la calidad de vida de los pacientes tratados con ICOCAV15, mostró que los dos perros diagnosticados de adenocarcinoma pulmonar (PSit05 y PSit08) tuvieron un aumento en la puntuación dada por los propietarios, indicando una mejora en su calidad de vida. Ambos pacientes, teniendo en cuenta el criterio de los propietarios, mostraban más actividad en casa, volvieron a realizar antiguos hábitos (por ejemplo, uno de ellos dormir boca arriba en la terraza de su casa) que no realizaban desde que empezaron a mostrar síntomas asociados al tumor. Así mismo, mostraron una mejoría en su estado de ánimo que se reflejaba en sus actividades diarias. PSit05, en la última puntuación, presentó un severo empeoramiento de su calidad de vida debido a sintomatología agravada asociada al tumor y el propietario solicitó su eutanasia. Sin embargo, el tratamiento con ICOCAV 15 no afectó a los hábitos de los demás pacientes (4/8), los cuales no mostraron mejoría ni tampoco empeoramiento en sus capacidades diarias, y por tanto, en su calidad de vida (Figura 27).

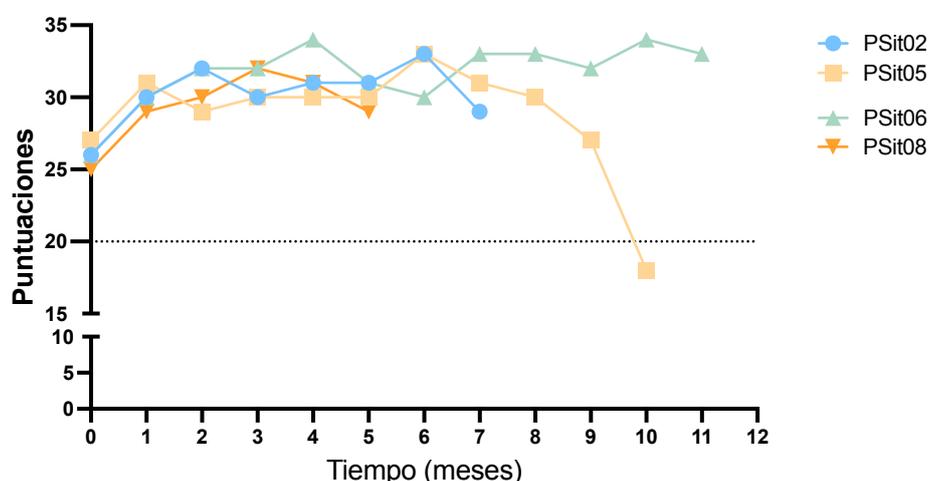


Figura 27. Representación de los resultados obtenidos en los cuestionarios de calidad de vida de los pacientes. La línea discontinua marca el límite inferior de una buena calidad de vida (124).

La paciente PSit09 se mantuvo con tratamiento analgésico (tramadol 2 mg/kg dos veces al día) para controlar el dolor causado por una nueva metástasis en la pelvis tras la primera dosis de ICOCAV15, no obstante, no mostró empeoramiento de la calidad de vida.

RESPUESTA DE LOS TUMORES TRATADOS

Un total de ocho perros recibieron tratamiento intratumoral con ICOCV15, siete de los cuales se trataron con una segunda dosis tras 4 meses de media tras la primera dosis (mínimo 76 días, máximo 166 día) y dos perros, PSit04 y PSit06, recibieron una tercera dosis a los 3 y 4 meses de haber recibido la segunda respectivamente.

La respuesta local de los tumores tratados se evaluó utilizando los valores de la suma de los diámetros (*Baseline Sume Diameter*, BSD) y comparándolo con los valores de BSD previos al tratamiento. Dos pacientes diagnosticados de SCC mostraron una reducción del 22% (PSit02; de 4,5 cm a 3,5 cm) y del 61,2% (PSit04; BSD de 6,7 cm a 2,6 cm) del tumor primario hasta el tercer mes después del tratamiento (Figura 28, 3^{er} mes). Posteriormente, se observó una progresión de la enfermedad en ambos pacientes y la reinoculación de ICOCV15 no redujo la carga tumoral (Figura 28, 6^o mes).



Figura 28. Respuesta local al tratamiento con ICOCV15 de los perros con carcinoma de células escamosas (SCC). SCC en el plano nasal en PSit02 y en la región gingival maxilar no tonsilar en PSit04. Tiempos indicados tras la primera inoculación de ICOCV15 (pre-tratamiento) hasta 7,5 meses de PSit02 y 9 meses de PSit04.

El paciente PSit06 (adenocarcinoma nasal) tuvo una reducción total del 50,1% (BSD de 14 cm a 6,98 cm) del tumor primario a los 8 meses de tratamiento, tras la segunda dosis de ICOCV15 (Figura 29). Cuatro meses más tarde, y tras la tercera dosis, el tumor aumentó de tamaño de nuevo (9,7cm). Un año después de la progresión del tumor, sin administrar ninguna dosis adicional ni otros tratamientos, el tumor del paciente PSit06 se redujo de nuevo hasta los 7 cm (Figura 29). En el caso de la paciente con una metástasis en la pared costal de un SCC de mama (PSit09) se trató la metástasis costal. Logró una reducción del 48,2% de la masa tumoral localizada entre la cuarta y sexta

costilla del lado derecho (BSD de 8,1 cm a 4,2 cm) en el sexto mes tras la primera inoculación, sin embargo, tras administrar una segunda dosis no se obtuvo respuesta (Figura 29).

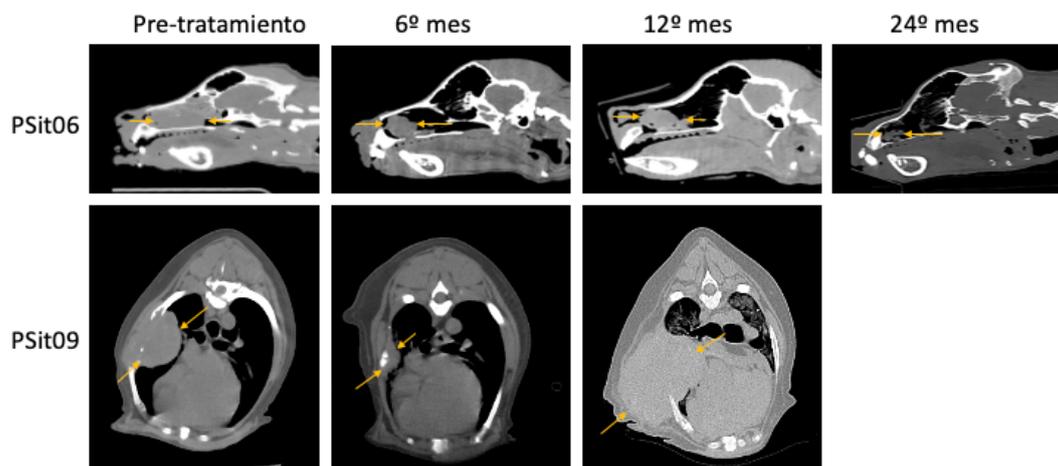


Figura 29. Evolución del adenocarcinoma nasal (PSit06) y de la metástasis del SCC en la pared costal (PSit09) mediante tomografía computarizada (CT). Para el paciente PSit06 se muestran imágenes de cortes sagitales de CT, e imágenes de cortes transversos para PSit09. Las flechas indican el diámetro mayor de la lesión, en el día pretratamiento y a los meses 6, 12 y 24 tras la primera inoculación de ICOCV15.

BENEFICIO CLÍNICO DEL TRATAMIENTO CON ICOCV15

Se siguieron los criterios RECIST para evaluar la respuesta al tratamiento de cada paciente. Tras la primera inoculación de ICOCV15, todos los perros mostraron un beneficio clínico: seis de los ocho perros consiguieron estabilizar la enfermedad (*stabilization disease, SD*) y dos perros respondieron parcialmente al tratamiento (*partial response, PR*). Los dos perros que presentaron PR eran los diagnosticados con SCC, y mantuvieron la respuesta hasta el tercer y quinto mes después de recibir la primera dosis (PSit04 y PSit09, respectivamente) (Figura 30). Tras la segunda dosis de ICOCV15, PSit04 mostró una estabilización de la enfermedad que mantuvo durante tres meses, y posteriormente la enfermedad progresó. PSit09 desarrolló una metástasis en el hueso iliaco derecho dos meses después de su inclusión en el estudio; no obstante, la evaluación de la lesión primaria, que fue la lesión tratada, mostró una buena respuesta a la inoculación intratumoral con ICOCV15.

Los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma (PSit01 y PSit06) mantuvieron la SD durante 4 meses, después de haber recibido la primera dosis, y en ese momento ambos tuvieron una PR al tratamiento, sin necesidad de recibir una nueva dosis de ICOCV15. Siguiendo el protocolo establecido y autorizado para el ensayo, se les inoculó la segunda

dosis de virus oncolítico a los 4,5 meses después de haber recibido la primera dosis. PSit06 mantuvo la respuesta al tratamiento con una PR durante 4 meses. (Figura 30). El paciente PSit02 y PSit08 estabilizaron la enfermedad (SD) tras el primer mes desde la primera dosis y mantuvieron la estabilización durante 3 y 4 meses respectivamente hasta que la enfermedad progresó. Ambos recibieron la segunda dosis a los tres meses, en el caso de PSit08, la progresión se mantuvo hasta que abandonó el estudio a los seis meses totales en tratamiento, mientras que PSit02, volvió a SD durante tres meses hasta que la enfermedad volvió a progresar a los 5 meses para mantenerse así hasta la retirada del estudio. El paciente PSit05 se mantuvo en SD desde el inicio del tratamiento hasta que a los 11 meses la enfermedad progresó. El paciente PSit07 solo permaneció en el estudio durante 21 donde la enfermedad se mantuvo en SD. (Figura 30).

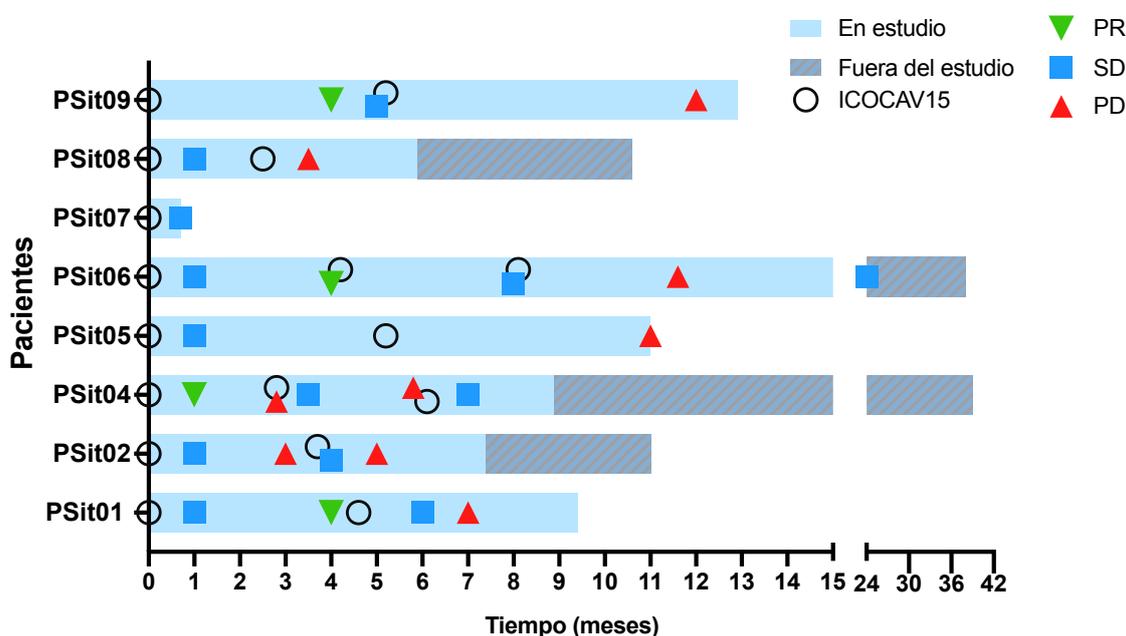


Figura 30. Respuesta clínica y tiempo de supervivencia de los perros tratados con ICOCV15. Se muestra en celeste el tiempo que cada paciente permaneció en el estudio y en rayado el periodo a partir de su salida del estudio. La respuesta clínica según RECIST se representa en la figura únicamente cuando se produce un cambio de respuesta clínica. Las mediciones se tomaron antes de cada nueva dosis de ICOCV15. ○: inoculación de ICOCV15; PR: respuesta parcial (▼); SD: enfermedad estable (■); PD: enfermedad progresiva (▲).

Tras la primera dosis de tratamiento, seis de los ocho los pacientes del estudio tuvieron una SD, en cambio, PSit04 y PSit09 tuvieron una PR (Tabla 11). En el momento de la segunda dosis, tres de los siete perros (PSit05, PSit08 y PSit09) se encontraban en SD y la mantienen durante 6, 1 y 7 meses respectivamente (desde la segunda dosis), hasta que presentan PD. Dos de los siete perros, PSit01 y PSit06 se encontraban en PR y la

mantienen tras 1,5 y 4 meses respectivamente donde se estabiliza en ambos casos. Por último, en el caso de los pacientes PSit02 y PSit04, en el momento de la segunda dosis se encontraban en PD y tras ella ambos tuvieron SD durante 1 y 2,5 meses respectivamente (Tabla 11). Por último, dos perros recibieron una tercera dosis. PSit04 se encontraba en PD y un mes más tarde tuvo un SD. PSit06 se encontraba en SD, y se mantuvo durante 4 meses hasta que progresó, para, un año más tarde y sin ningún tratamiento, tener una SD (Tabla 11).

	1ª DOSIS	2ª DOSIS	3ª DOSIS
PR	2/8	2/7*	0/2
SD	6/8	5/7**	2/2***
PD	0/8	0/7	0/2

Tabla 11. Respuesta clínica según RECIST en función del número de dosis administradas. * seguido de SD a los 1 y 4 meses. ** seguido de PD a los 1, 2, 5, 6 y 7 meses. *** en 1/2 seguido de PD a los 4 meses.

EVALUACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL

La supervivencia global (*overall survival*, OS) de los perros tratados con ICOCAV15 se comparó con el tiempo medio de supervivencia (MST) descrito específicamente para cada tipo tumoral, según referencias bibliográficas. Seis de los ocho perros (excepto PSit07 y PSit09) tratados con ICOCAV15 mostraron una OS superior a 9 meses tras la primera administración. Dado que no hay datos específicos para la metástasis de un tumor no tratado previamente, no se pudo estimar el MST para la paciente PSit09 (Figura 31). En el caso de PSit04 y PSit06 siguen vivos tras más de tres años desde el inicio del tratamiento (Figura 31).

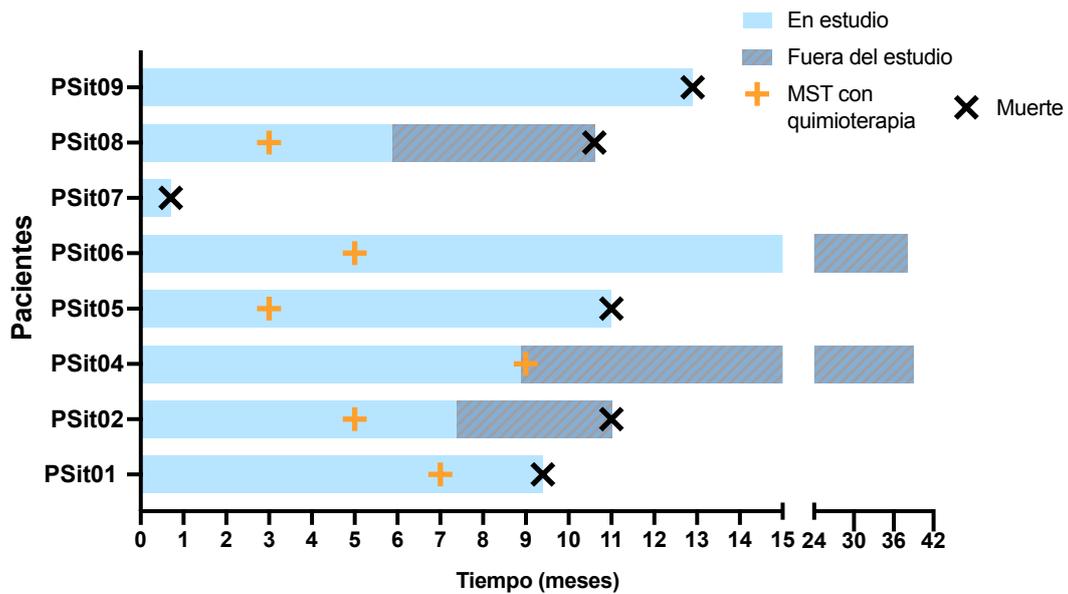


Figura 31. Supervivencia global de los perros tratados con ICOCV15. Se muestra en celeste el tiempo que cada paciente permaneció en el estudio y en rayado el periodo a partir de su salida del estudio para representar la supervivencia global. ×: eutanasia del perro tratado; MST: tiempo medio de supervivencia con el tratamiento estándar para cada tipo de tumor (+).

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

Se cuantificaron las poblaciones de células inmunes en sangre periférica mediante citometría de flujo. Con relación a las poblaciones de linfocitos, se observó un aumento de los linfocitos B tras la primera dosis en seis de los ocho pacientes (excepto PSit05 y PSit09) (Figura 32). Las modificaciones de los linfocitos T totales no siguieron un patrón común entre los pacientes (Figura 32).

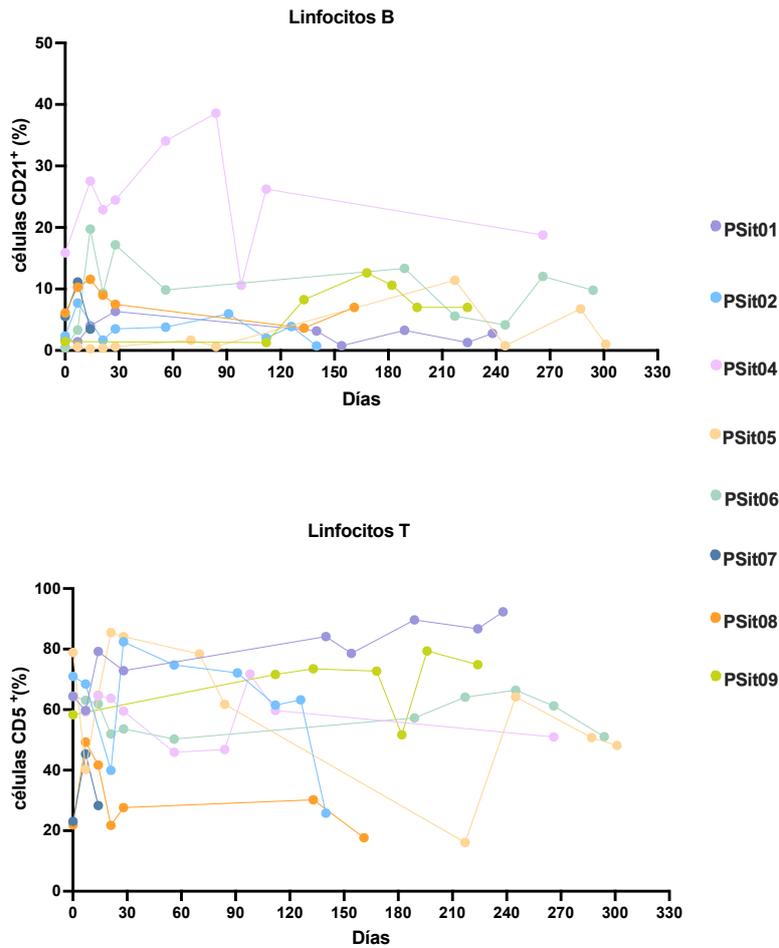


Figura 32. Inmunofenotipado en sangre periférica de los perros tratados con ICOCV15. Cuantificación de linfocitos B (CD21⁺), T (CD5⁺) en el pre-tratamiento (d0) y hasta 300 días después de la primera dosis.

Las subpoblaciones de los linfocitos T también se vieron modificadas a lo largo del seguimiento, mostrando un aumento de los linfocitos citotóxicos (CD8⁺) en siete de los ocho pacientes tras recibir la primera dosis (la excepción fue PSit05) (Figura 33). La subpoblación de T CD4⁺ no mostró una tendencia generalizada en los pacientes durante el estudio (Figura 33).

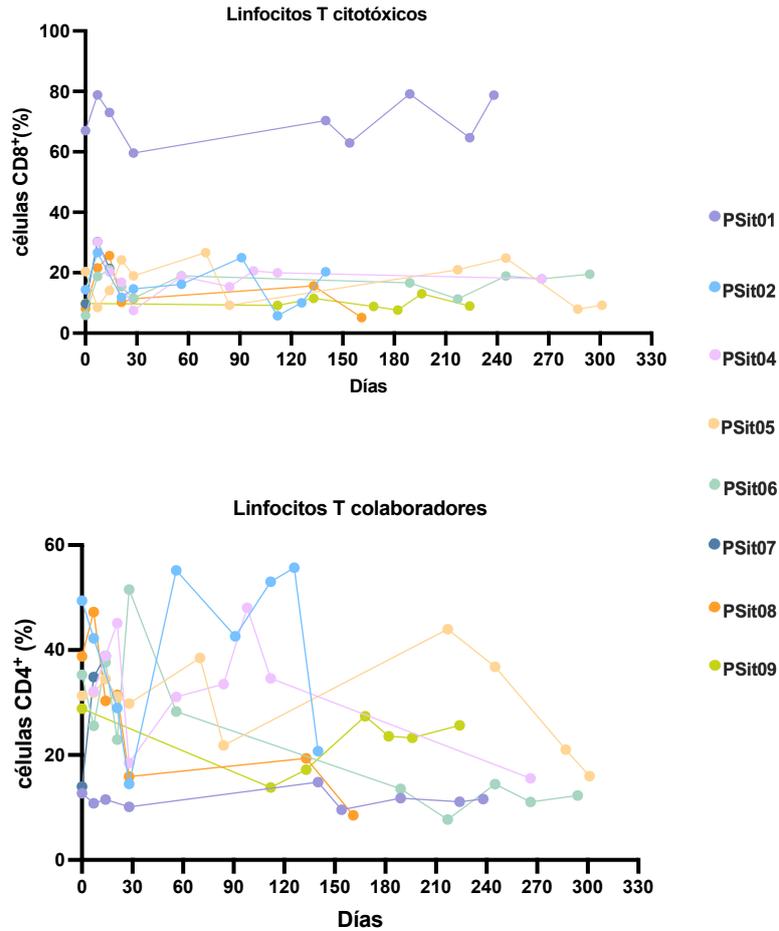


Figura 33. Inmunofenotipado en sangre periférica de los perros tratados con ICOCAV15. Cuantificación de linfocitos T citotóxicos (CD8⁺) y colaboradores (CD4⁺) en el pre-tratamiento (d0) y hasta 300 días después de la primera dosis.

Se cuantificaron también las poblaciones de NK y monocitos, sin embargo, no se observó ninguna alteración generalizada entre todos los pacientes del estudio (Figura 34).

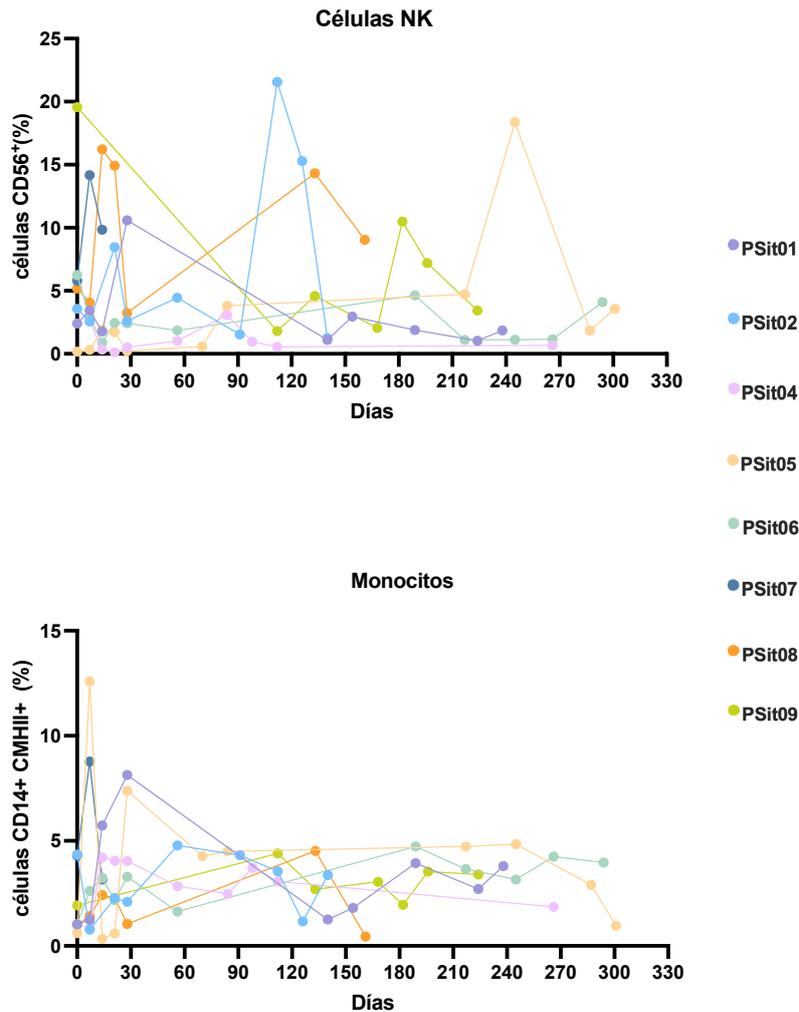


Figura 34. Inmunofenotipado en sangre periférica. Cuantificación de NK (CD56⁺) y Monocitos (CD14⁺ CMHII⁺) en el pre-tratamiento (d0) y durante el seguimiento.

Por otro lado, se evaluó el infiltrado de células inmunes en los tumores tras el tratamiento con ICOCAV15. En los pacientes PSit02, PSit04 y PSit06 observamos que la infiltración de linfocitos T (CD3⁺) y B (CD20⁺) aumentó tras el tratamiento con ICOCAV15 (Figura 35). Se observó un aumento de los linfocitos después de la primera dosis en el día 28, y después de la segunda dosis en los días 140 y 185 para los pacientes con SCC (PSit02 y PSit04) (Tabla 12). En el caso del paciente PSit06, mostro una disminución de los linfocitos T (CD3⁺) tras la segunda dosis (118 días después) seguido de un aumento tras la tercera dosis (a los 106 días); además, un aumento de los linfocitos B (CD20⁺) tras la primera dosis (a los 126 días) y tercera dosis (106 días después). Los pacientes PSit07 y PSit08 (a los días 21 y 42, respectivamente) mostraron una reducción de los linfocitos T y B después de la primera dosis (Tabla 12). PSit09 mostró menos infiltración de linfocitos T en la necropsia comparada con la del día de inicio del tratamiento. PSit05, diagnosticado de carcinoma pulmonar, fue el único paciente que no presentó linfocitos B en el tumor en ninguna de las muestras evaluadas.

Los linfocitos T CD4⁺ aumentaron tras la inoculación de ICOCV15 en los pacientes PSit02, PSit04 y PSit06 (Figura 35 y Tabla 12). En los casos de PSit02 y PSit04 (ambos SCC) aumentó a los 28 días tras la primera dosis. Además, en PSit02 también lo hizo tras 109 días de la segunda dosis. En ambos casos, se redujo en el momento de la necropsia. En el paciente PSit06, aumentó 118 días después de la segunda dosis (Tabla 12).

Tras la inoculación de ICOCV15, los monocitos/macrófagos infiltrados aumentaron en cinco de los ocho pacientes. En el caso de PSit02 aumentó tras la segunda dosis y permanecieron elevados hasta la necropsia (210 días tras la última dosis). En el caso de PSit04 y PSit06 aumentaron tras la primera y segunda dosis. También se observó un aumento de MAC387⁺ en los tumores evaluados en las necropsias de PSit07 y PSit09 (21 días y 210 días después de la última dosis, respectivamente). El mayor número de MAC387⁺ infiltrados se detectó tras la segunda dosis en los pacientes con SCC, PSit02 y PSit04, coincidiendo con el aumento de linfocitos B y T (Tabla 12).

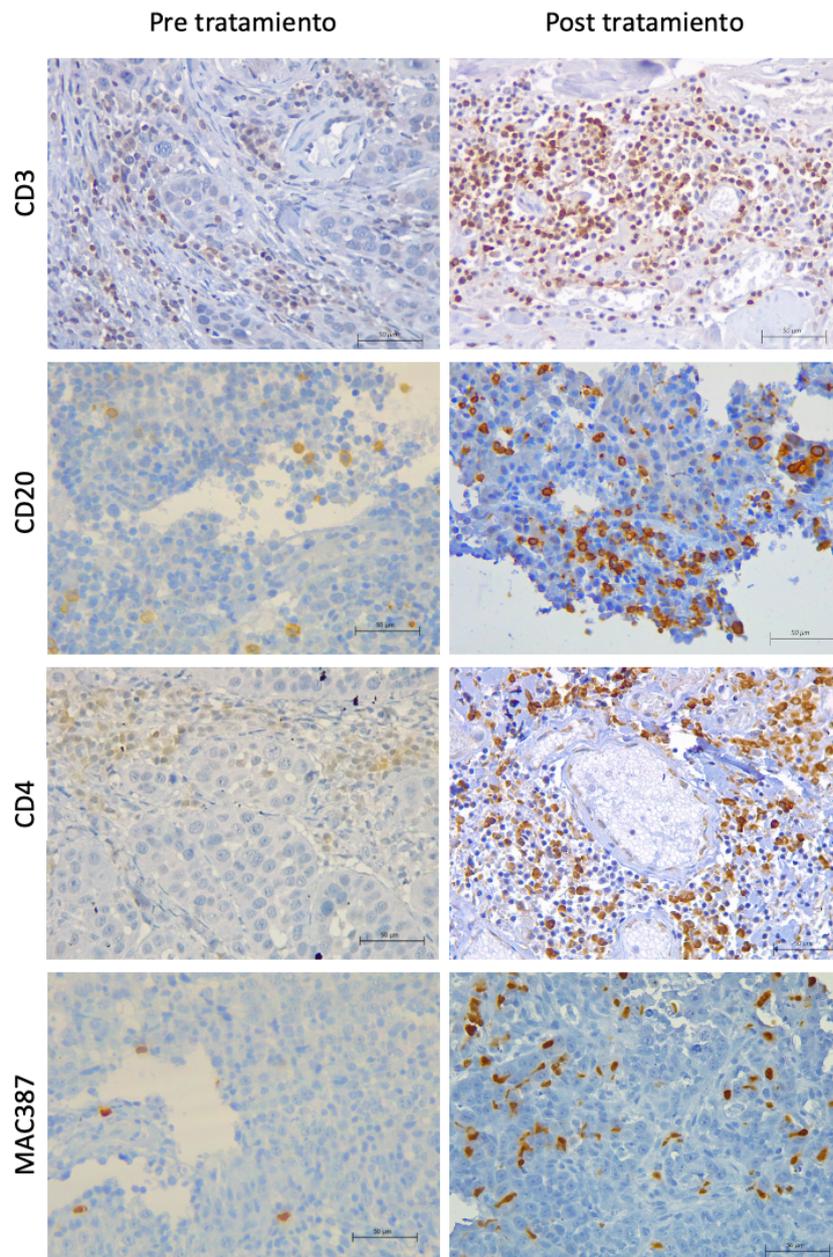


Figura 35. Infiltrado inmune en los tumores tratados. Células inmunes infiltradas (marrón), y núcleos (azul). Muestras de tumor tomadas antes (izquierda) y después (derecha) del tratamiento. Los tiempos de post-tratamiento de los linfocitos T (CD3⁺) son día 332 (PSit02), los linfocitos B (CD20⁺) día 332 (PSit02), linfocitos T CD4⁺ día 126 (PSit06), y monocitos/macrófagos (MAC387⁺) día 28 (PSit06). Barra de escala: 50 μ m.

Cinco de los ocho perros incluidos en el estudio fueron negativos para el marcador pronóstico CD31⁺ (128,129) antes de ser tratados, y la mayoría de ellos (cuatro de cinco) presentaron niveles bajos en algún momento del seguimiento. Dos perros (PSit06 y PSit07) presentaban niveles reducidos de células endoteliales, alcanzando valores indetectables en algunos momentos del seguimiento. No se encontraron cantidades moderadas ni altas de este marcador en ninguna de las muestras.

			CD3	CD4	CD20	MAC387	CD31
PSit01	Necropsia (d282)	Tumor	Medio	Negativo	Bajo	Bajo	Negativo
		Pulmón (M)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		Hígado (M)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		Bazo	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
PSit02	Tumor	d0*	Medio	Negativo	Medio	Medio	Negativo
		d28	Alto	Alto	Alto	Medio	Negativo
		d112*	Medio	Medio	Medio	Medio	Negativo
		d140	Alto	Medio	Alto	Alto	Bajo
		d221	Medio	Alto	Alto	Alto	Bajo
	Necropsia (d332)	Tumor	Alto	Medio	Alto	Alto	Bajo
		Hígado	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		Bazo	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
PSit04	Tumor	d0*	Bajo	Bajo	Medio	Bajo	Negativo
		d28	Alto	Medio	Alto	Medio	Bajo
		d84*	Medio	Medio	Medio	Medio	Bajo
		d185*	Alto	Medio	Alto	Alto	Bajo
PSit05	Necropsia (d332)	Tumor	Medio	Bajo	Negativo	Alto	Bajo
		Hígado	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		Bazo	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
PSit06	Tumor	d0*	Alto	Bajo	Medio	Bajo	Negativo
		d28	Alto	Bajo	Medio	Medio	Bajo
		d126*	Alto	Bajo	Alto	Negativo	Negativo
		d244*	Bajo	Medio	Negativo	Bajo	Negativo
		d350	Alto	Medio	Medio	Bajo	Bajo
PSit07	Tumor	d0*	Alto	Medio	Medio	Bajo	Bajo
	Necropsia (d21)	Tumor	Medio	Medio	Negativo	Medio	Negativo
		Hígado	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		Bazo	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
PSit08	Tumor	d0*	Alto	Bajo	Medio	Bajo	Negativo
		d42	Bajo	Bajo	Negativo	Bajo	Negativo
PSit09	Tumor	d0*	Alto	Alto	Bajo	Bajo	Negativo
	Necropsia (d389)	Tumor Pelvis (M)	Medio	Medio	Bajo	Medio	Bajo
		Tumor	Bajo	Medio	Bajo	Medio	Negativo

Tabla 12. Células inmunes infiltradas en el tumor, marcador pronóstico CD31⁺. En las necropsias se indican los días post-primera dosis. M: Tejido metastásico. N/A: no evaluado

BIODISTRIBUCIÓN DE ICOCV15 Y RESPUESTA ANTIVIRAL

El DNA adenoviral de ICOCV15 se detectó mediante PCR cuantitativa en biopsias tumorales tras la primera y segunda inoculación en el paciente PSit04 a los días 28 de la primera dosis de tratamiento (828 vp/mg de tejido) y a los 101 días tras la segunda dosis (8731 vp/mg de tejido), respectivamente (Tabla 13).

La presencia de ICOCV15 en los tumores tratados se confirmó por inmunohistoquímica en las biopsias (tres de cuatro pacientes) durante el seguimiento, y en todos los pacientes evaluados en la necropsia (cinco pacientes en total) (Figura 36A, 36B y Tabla 13). Para estudiar la biodistribución de ICOCV15, inoculado intratumoralmente, se analizaron el resto de los órganos sanos en las necropsias disponibles (cuatro perros). El virus oncolítico se detectó en el hígado (tres de cuatro) (Figura 36E) y en el bazo (tres de cuatro) (Figura 36D) de muestras de pacientes post-mortem (Tabla 13). También hay que destacar la detección de virus en dos de los pacientes (PSit01 y PSit09) en muestras obtenidas durante las necropsias de metástasis distales (Figura 36C).

En el caso del paciente PSit02 se detectó ICOCV15 mediante IHQ 28 días tras la primera dosis, y 109 días tras la segunda dosis. Todas las muestras analizadas en la necropsia fueron positivas tras 220 días desde la última dosis. En el caso de PSit06 todas las muestras de tumor tomadas durante los 350 días del estudio resultaron positivas a ICOCV15 mediante IHQ (Tabla 13).

En el caso de PSit01, PSit05, PSit07 y PSit09 solo fue posible analizar las muestras de tejido obtenidos de las necropsias. En el caso de PSit01, el tumor y las metástasis distales en hígado (no tratadas) resultaron positivos tras 139 días tras la última dosis. En el caso de PSit05 las muestras tanto del tejido tumoral como de tejido sano esplénico también fueron positivas tras 155 días desde la última dosis. Para el paciente PSit07 la necropsia se realizó 21 días tras la primera dosis y todos los tejidos estudiados fueron positivos a la presencia de ICOCV15. Y por último, en el paciente PSit09 resultaron positivas las muestras de tejido tumoral, así como tejido de una metástasis en las pelvis tras 166 días desde la última dosis (Tabla 13).

Detección de ICOCAV15			
PSit 01	Necropsia (día 282)	Tumor	Positivo
		Pulmón (M)	Negativo
		Hígado (M)	Positivo
		Bazo	Negativo
PSit02	Tumor	d28	Positivo
		d112 *	Negativo
		d140	Negativo
		d221	Positivo
	Necropsia (día 332)	Tumor	Positivo
		Hígado	Positivo
		Bazo	Positivo
PSit04	Tumor	d28	Positivo #
		d84*	Negativo
		d185*	Positivo #
PSit 05	Necropsia (día 332)	Tumor	Positivo
		Hígado	Negativo
		Bazo	Positivo
PSit06	Tumor	d28	Positivo
		d126*	Positivo
		d244*	Positivo
		d350	Positivo
PSit07	Necropsia (día 21)	Tumor	Positivo
		Bazo	Positivo
		Hígado	Positivo
PSit08	Tumor	d42	Negativo
PSit09	Necropsia (día 389)	Tumor	Positivo
		Tumor Pelvis (M)	Positivo

Tabla 13. Biodistribución de ICOCAV15. Virus oncolítico detectado por qPCR (#) o por inmunohistoquímica. * Día en el que se trató con una nueva dosis de ICOCAV15. (M): Tejido metastásico.

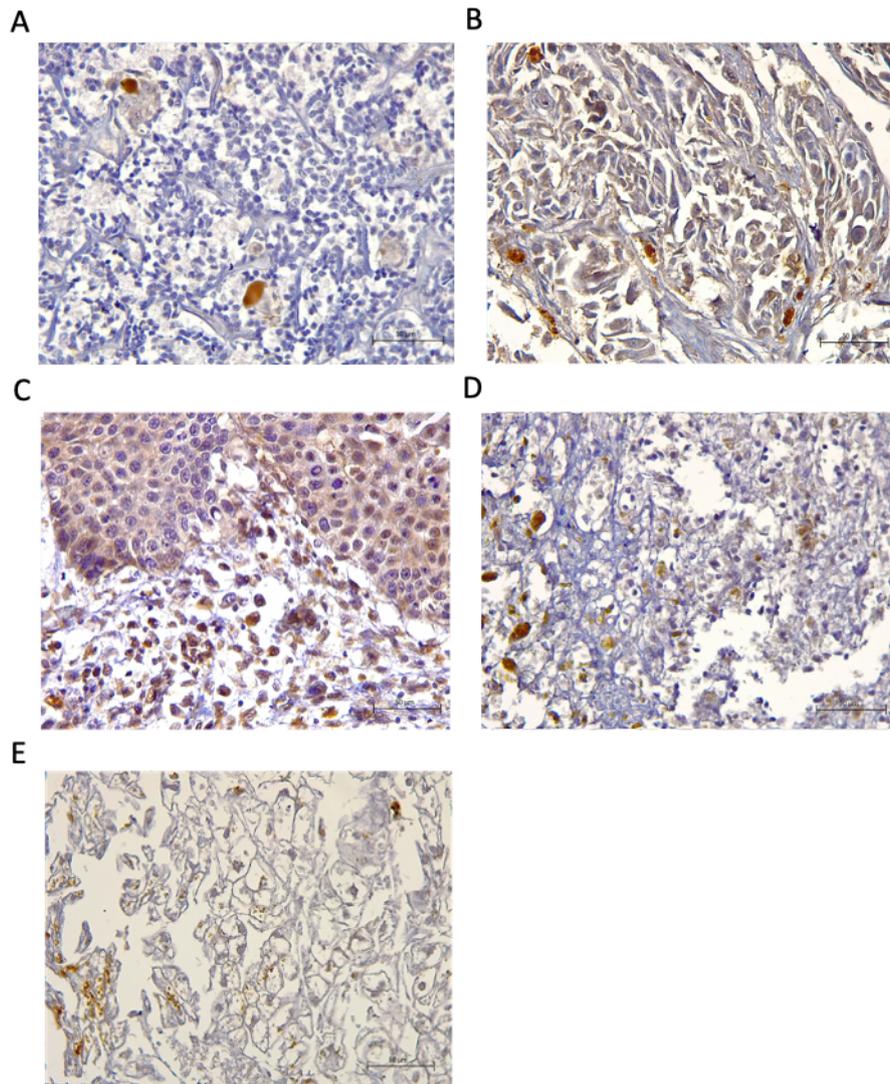


Figura 36. Detección de ICOCAV15 mediante inmunohistoquímica. (A-E) Imágenes representativas de tejidos que muestran células positivas al adenovirus (marrón). **(A)** PSit05 con carcinoma pulmonar 177 días después de la última dosis de ICOCAV15. **(B)** PSit07 con SCC 21 días después de la última dosis de ICOCAV15. **(C)** Metástasis a distancia (SCC pared costal, PSit09) 166 días tras la última dosis de ICOCAV15. **(D)** Bazo (carcinoma pulmonar, PSit05) 177 días después de la última dosis. **(E)** Tejido hepático (SCC plano nasal, PSit07) 21 días después de la última dosis. Barra de escala: 50 µm.

En el mes siguiente a la primera inoculación intratumoral de ICOCAV15, los anticuerpos anti-CAV2 en sangre periférica aumentaron en todos los pacientes, a pesar de que la mayoría de ellos (siete de ocho) se habían vacunado contra CAV2 antes del tratamiento. Los anticuerpos aumentaron en 20,7 unidades arbitrarias (*arbitrary units*, a.u) siete días después de la primera dosis (de 31,9 a 52,6) y aumentaron 25,8 a.u. (de 60,7 a 86,5) después de la segunda dosis con ICOCAV15 (Figura 37).

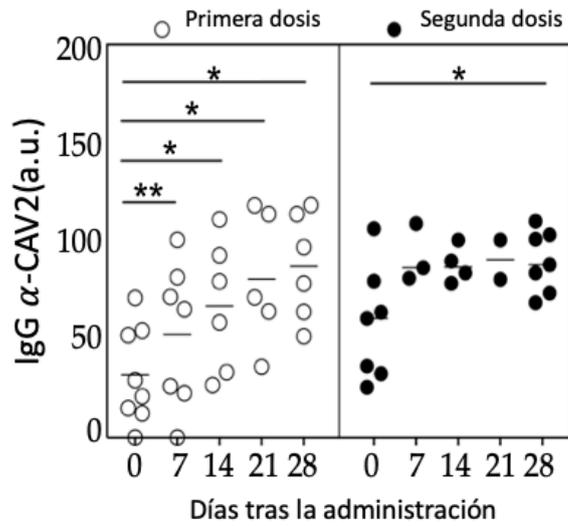


Figura 37. Respuesta antiviral durante el tratamiento. IgG α -CAV2 cuantificada por ELISA en fase sólida en sangre periférica. Se muestran datos individuales de cada paciente (o y ●) y la media (-) durante el tratamiento con ICOCV15. a.u.: unidades arbitrarias. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El aumento de los conocimientos sobre bienestar animal y la mayor concienciación entre los propietarios de mascotas, conjuntamente con los avances en medicina veterinaria que se han producido en las últimas décadas, han contribuido al aumento de la calidad y de la esperanza de vida de las mascotas (1,2). Esta mayor longevidad conlleva un aumento de la incidencia de las enfermedades relacionadas con la edad, como es el caso del cáncer (1).

Todo ello ha generado que la búsqueda de nuevas y mejores terapias oncológicas esté en auge en las últimas décadas, y como consecuencia, que la oncología veterinaria sea una especialidad de gran relevancia para el cuidado de las mascotas. Sin embargo, para la mayor parte de los tumores no existen terapias eficaces, ya que los tratamientos tradicionales como la quimioterapia, radioterapia y cirugía, aunque han avanzado tratando de reducir sus efectos adversos, aún presentan ciertas limitaciones y una toxicidad asociada debido a su baja especificidad (19,35,130–132). Es bien conocido que la inmunoterapia avanza como una alternativa a los tratamientos convencionales, ya que está mostrando resultados prometedores (57,133,134). Concretamente, la inmunoterapia basada en la utilización de virus oncolíticos se conoce como viroterapia oncolítica, y los resultados obtenidos la pueden llegar a posicionar como una de las posibles terapias prometedoras en el campo de la oncología (104,121,122). Uno de los campos que aborda la viroterapia es el tratamiento de tumores intracraneales, estudios *in vitro* y con modelos murinos han obtenido regresiones totales del tumor con tratamiento basado en el virus parvovirus H-1 (135). En pacientes caninos se han realizado estudios que han demostrado eficacia y seguridad con adenovirus para tratamiento de tumores en el SNC (17,60) y epidérmicos y óseos (117). En humanos, Talimogene laherparepvec, OV basado en HSV-1, es el único virus aceptado por la FDA para el tratamiento de melanoma maligno (92). Otros virus se encuentran en fase de ensayos clínicos en personas, como por ejemplo adenovirus como tratamiento de tumores sólidos incluido tumores pulmonares, herpes virus tipo 2 en pacientes con melanoma en fase IV (con metástasis a distancia) o el virus de la influenza en tumores de mama (58). Los estudios *in vivo* en veterinaria necesitan más representación en la comunidad científica ya que actualmente no hay ningún tratamiento en perros basado en la viroterapia oncolítica.

El objetivo principal de este proyecto fue, realizar un estudio piloto para evaluar la seguridad de la administración intratumoral de ICOCAV15 en pacientes caninos con carcinomas y adenocarcinomas accesibles. Además, de forma secundaria se evaluó la eficacia del tratamiento, intentando determinar los mecanismos implicados, evaluando la respuesta del sistema inmune, así como el tropismo viral.

El uso de adenovirus oncolíticos es una terapia antitumoral prometedora, ya que, gracias a la replicación condicional, el virus provoca la lisis de las células tumorales, hecho que a su vez parece inducir una estimulación del sistema inmune. Por todo ello, la viroterapia ha mostrado resultados interesantes en estudios clínicos humanos y veterinarios (60,117,136,137).

La propuesta de nuestro estudio se basa en resultados previos que se obtuvieron con ICOCAV cuando se administró vehiculizado con células madre mesenquimales, esta terapia recibió en nombre de Celyvir. El estudio veterinario con Celyvir se realizó para tratar tumores sólidos, y mostró una tasa de respuesta clínica del 74% en perros refractarios a otras terapias, además consiguió una mejoría en la calidad de vida de los pacientes (60). Aunque Celyvir ha mostrado una buena eficacia como tratamiento sistémico (60), todavía hay una tasa de tumores que no responden a esta terapia, y a pesar de que se desconoce la causa, cabe la posibilidad de que si se aumenta la dosis de virus oncolítico disponible en el tumor, la eficacia aumente.

Otros estudios han reportado que el 90% de los OV administrados por vía intravenosa, sin ningún acompañamiento por otras estructuras, son eliminados en las primeras 24 horas por elementos del sistema inmune (104,138), y, aunque la administración mediada por células es una forma de reducir este efecto no deseado, sigue existiendo el riesgo de que ocurra.

La administración intralesional de OV ya había sido explorada en estudios que la defienden frente a la administración intravenosa, dado que asegura la llegada del virus al tumor sin que el sistema inmune del animal lo elimine mientras se encuentra en circulación sanguínea, y también se evita la retención del OV en otros órganos y tejidos que actúan como filtros biológicos (90,139,140), no obstante tampoco es inocua y puede causar sangrados y lesiones en tejido en ciertos tumores como por ejemplo los intracraneales (90). Por todo ello, se hipotetizó que la inoculación intratumoral del adenovirus oncolítico ICOCAV15, podría mejorar la tasa de respuesta clínica que había mostrado previamente Celyvir.

Cabe señalar que, en el estudio de Celyvir mencionados anteriormente, se había realizado un protocolo de tratamiento semanal durante varios meses. En el presente estudio, se administró un máximo de tres dosis de ICOCAV15 (un perro con una dosis, cinco perros con dos dosis y dos perros con tres dosis). Esta reducción en el número de dosis se debe a que esperábamos obtener una mayor eficacia con la administración intratumoral. En el caso de Celyvir se obtuvo una respuesta del 74% con una dosis semanal de $0,5 \times 10^6$ células/kg en infusión intravenosa, en nuestro caso, obtuvimos una respuesta del 100% tras la primera dosis (25% de PR y 75% de SD) con una dosis total por infusión de 1×10^7 v.p..

Los pacientes incluidos en el estudio fueron sólo aquellos que tenían tumores accesibles, para evitar los riesgos asociados a la administración, y evitar procedimientos más invasivos, como un abordaje quirúrgico, que supusiera mayor tiempo de recuperación o probabilidad de complicaciones al paciente, ya que las complicaciones asociadas a un procedimiento quirúrgico mayor rondan de entre 3-17% (141), como por ejemplo alteraciones cardíacas en un 3% de los casos (142) o infecciones del sitio quirúrgico en un 10-20% (143).

En nuestro estudio, se incluyeron distintas razas caninas con sus propias peculiaridades y con distintas características intrínsecas como la edad o el sexo, además de diversidad en los tumores diagnosticado debido a la dificultad de reclutar pacientes caninos con características idénticas entre sí. Esta situación supuso una limitación ya que aumentó la variabilidad de los datos obtenidos en el estudio.

En nuestro estudio, para evaluar la seguridad de la administración local de ICOCAV15, se realizó exámenes clínicos completos y análisis de sangre en los pacientes caninos. Ningún perro desarrollo efectos secundarios negativos asociados al tratamiento como los reportados utilizando otras viroterapias, siendo fundamentalmente síntomas gripales leves o alteraciones en la coagulación asociadas al tratamiento en otros estudios similares en los que se utilizó ICOCAV17 intratumoral (117). Otros estudios con administración intravenosa de ICOCAV17 detectaron alteraciones leves a nivel dermatológico, diarreas y cuadro de orquitis aunque no se pudo asociar directamente como causa del tratamiento (60); en nuestro estudio no se observaron este tipo de alteraciones clínicas. Los estudios que han optado por una administración intravenosa de tratamientos basados en adenovirus no han demostrado ningún efecto adverso grave que se asocie directamente al tratamiento en los pacientes (60,144,145). Se debe destacar que ninguno de nuestros pacientes desarrolló ninguna reacción anafiláctica, ni sistémica ni a nivel local, tras la inoculación del tratamiento.

Los perros tratados con ICOCAV15, no solo no presentaron ningún efecto secundario negativo, sino que ninguno de ellos experimentó un empeoramiento en su calidad de vida según se observó a través del cuestionario de calidad de vida realizado a los propietarios (124). En medicina veterinaria no existe un protocolo establecido para la evaluación de este factor tan importante como es la calidad de vida del paciente. En nuestro caso adaptamos un cuestionario de un estudio que evaluaba pacientes caninos con cáncer y abordaba cuestiones desde la sociabilización del animal, hábitos de auto cuidado, alimentación, actividad física y capacidad de realizar acciones básicas por sí mismo (124). Algunos de ellos, los que padecían carcinoma pulmonar (PSit05 y PSit08), mostraron incluso mejoría en su calidad de vida desde que empezaron con el tratamiento. Los pacientes que presentaban lesiones en la nariz, con dificultades y

molestias respiratorias (PSit02 y PSit06), notaron mejoría en la sintomatología ya que la respuesta tumoral mejoro directamente su capacidad respiratoria. Otros estudios han reportado un aumento de la calidad de vida de los pacientes caninos con cáncer tras la administración del adenovirus oncolítico ICOCAV17 (60,117) , coincidiendo con nuestro estudio, donde los propietarios han descrito una mejoría en el estado anímico de sus mascotas y una mayor vitalidad. Es importante tener en cuenta que en medicina veterinaria la reducción del tamaño tumoral suele acompañar a una mejor calidad de vida del paciente.

Con relación a las alteraciones patológicas reflejadas en las analíticas sanguíneas, no se han reportado relevantes efectos tóxicos asociados al tratamiento con adenovirus tanto en administración intravenosa como intratumoral en otros estudios de en perros (60,117,146,147) excepto una leve neutropenia en administración intravenosa (147). En nuestro caso, en dos pacientes (PSit01 y PSit02) observamos una elevación de las transaminasas hepáticas tras el tratamiento con ICOCAV15, que no se había descrito previamente como un posible efecto adverso. PSit02 presento en una de las revisiones la enzima ALT elevada, pero la enzima AST se mantuvo estable durante todo el seguimiento. Aunque la ALT predomina en el tejido hepático, ésta no es su única localización; por lo tanto, si no hay un aumento de ambas enzimas hepáticas, la ALT no debería asociarse a un daño hepático concreto (148). Además de que esta elevación no se acompañó con ningún signo más asociado a daño hepático o cualquier otra sintomatología, fue clasificada como grado 1 de gravedad y no requirió intervención de ningún tipo. El perro PSit01 presentaba una lesión metastásica en el parénquima hepático en el momento en que las transaminasas hepáticas comenzaron a elevarse. Las lesiones tumorales en el hígado se han asociado a una elevación de estas enzimas, por lo que es posible que la elevación de AST y ALT en PSit01 no indicara que ICOCAV15 estuviera causando daños en el tejido sano (148,149), sino que fuera por el propio daño en los hepatocitos causado por el desarrollo de las metástasis. En estudios previos con viroterapia utilizando adenovirus oncolíticos en medicina veterinaria no se reportaron afecciones hepáticas asociadas al tratamiento tanto en administración intravenosa como intratumoral (117,147). Otro de los parámetros analíticos que mostraron alteraciones en dos de nuestros pacientes, fue la creatinina, ya que se detectó una elevación en PSit01 y PSit09. El daño renal o elevación de estos parámetros no se reporta en otros estudios con adenovirus como posibles efectos adversos asociados al tumor (60,117,146,147). En los casos concretos de nuestros pacientes, estaba posiblemente asociado a un infarto renal diagnosticado en PSit09, y a una hipercalcemia paraneoplásica en PSit01 (35,150). Además, teniendo en cuenta un estudio anterior de otros autores (117) en los que uno de los pacientes desarrollo coagulación intravascular diseminada (CID) tras el tratamiento con administración intratumoral de ICOCAV17, los parámetros de coagulación se evaluaron cuidadosamente y con frecuencia en nuestro estudio, pero los perros tratados con ICOCAV15 intratumoralmente, no mostraron

ninguna alteración clínicamente relevante. Es importante mencionar que la diferencia de ICOCAV17 frente a ICOCAV15 es la presencia de hialuronidasa en el primero con el fin de hacer más permeable la membrana celular y facilitar la infección del virus, lo que ha podido asociarse a posibles efectos tóxicos, no obstante recientes estudios en modelos murinos con adenovirus cargados de hialuronidasa han obtenidos resultados sin toxicidad asociada a esta característica (151).

Todos los resultados obtenidos en el presente estudio, relacionados con la seguridad del tratamiento con ICOCAV15, son un punto más a favor de la utilización de la viroterapia frente a la quimioterapia que es uno de los tratamientos más habituales en perros, donde sus efectos tóxicos son frecuentemente los que limitan el propio tratamiento empeorando la calidad de vida del paciente y por tanto su eficacia (130,131,152).

En veterinaria no existe un criterio estandarizado para evaluar la respuesta de tratamientos oncológicos basados en la inmunoterapia, y por ello la mayoría de los estudios utilizan los criterios RECIST a pesar de que no tienen en cuenta las particularidades que pueden presentar los tumores tratados con inmunoterapias, como por ejemplo los episodios de pseudoprogresión, definidos como un aumento en el tamaño tumoral previo a la posterior reducción del mismo (139,153) Las inmunoterapias deberían ser evaluadas teniendo en cuenta la mayor o menor activación que producen en el sistema inmune, además de la respuesta del tumor a la terapia, que no siempre se determina por una reducción de su tamaño en tiempos cortos. Si bien es cierto que la reducción del tamaño en la masa o lesión tumoral debe asociarse siempre con eficacia del tratamiento, el aumento de esta no siempre quiere decir que sea un resultado negativo cuando se tratan con inmunoterapias, y es donde los criterios RECIST 1.1 no siempre expresan todas las variables atípicas hasta el momento como la pseudoprogresión, que se producen durante las nuevas terapias como la inmunoterapia. Existe una modificación de los criterios con nuevas guías para tratamientos con inmunoterapia denominados iRECIST que completa la información obtenida con los criterios RECIST 1.1 (154). Idealmente, debería utilizarse el *immune-related response criteria* (irRC), un criterio incorporado en 2009 que incluía medidas bidimensionales y define cuando los tumores responden al tratamiento, se estabilizan, o progresan durante el tratamiento, cuando el tratamiento es una inmunoterapia, no obstante a menudo no se aplicaba de forma coherente y preocupaba la baja comparabilidad de los resultados (155). Los criterios iRECIST, al publicarse en 2017, aún no han obtenido resultados suficientes como para imponerse frente a los RECIST 1.1, no obstante se recomienda tenerlos en cuenta (156). En medicina veterinaria se utilizan unos criterios consensuados por el Grupo Cooperativo Oncológico Veterinario (VCOG) que adaptan los criterios RECIST 1.1 de humanos para poder aplicarlos de una manera sencilla a los tumores sólidos caninos, llamados cRECIST (canine RECIST) (125). Según RECIST, la respuesta se puede categorizar como respuesta parcial (PR), completa (CR),

estabilización de la enfermedad (SD) o progresión de la enfermedad (PD) (125). Además, con el fin de obtener más información sobre el beneficio clínico que ofrecía el tratamiento con ICOCAV15, decidimos evaluar como parámetro de respuesta, el tiempo libre de progresión y el tiempo de supervivencia global de nuestros pacientes con respecto al reportado en otros estudios similares con perros tratados con terapias quimioterápicas convencionales en cada tipo de tumor.

En nuestro caso, los perros tratados mostraron, tras la primera dosis de ICOCAV15, una tasa de respuesta PR del 25%, y el 75% restante consiguió SD. Nuestros resultados mostraron que los pacientes con una primera respuesta al tratamiento mantuvieron un mejor pronóstico a largo plazo durante al menos 3 meses. Además, estos pacientes presentaron una mejor tasa de respuesta cuando fueron tratados con una segunda dosis de ICOCAV15, aunque el tiempo de supervivencia libre de progresión (*Progression-free survival*, PFS) fue menor que tras la primera administración. Esta respuesta diferencial a las dosis posteriores es bien conocida en inmunoterapia, en la que los tumores pueden adaptarse y hacerse resistentes al tratamiento (157) Siendo, entre los virus oncolíticos estudiados que muestran un eficacia disminuía debido a las resistencias, los descritos con mayor frecuencia el virus de la estomatitis vesicular, el herpes virus y el adenovirus (158).

Una limitación de nuestro estudio ha sido el no disponer de un grupo control tratado con terapia convencional (quimioterapia) en paralelo al grupo de perros tratados con ICOCAV15, hecho que nos hubiera permitido hacer una comparación más precisa entre casos. Debido a que este estudio se propuso como un tratamiento de uso compasivo, exigía únicamente un brazo de pacientes tratados con ICOCAV15. Debido a la falta de un histórico de casos en el HCV-UAX, se comparó la supervivencia de los perros tratados con la descrita en la bibliografía, a pesar de que los tiempos descritos puedan variar entre centros, debido a un mejor o peor manejo, dependiendo de los protocolos de actuación, que son particulares para cada centro veterinario. La supervivencia de seis de los ocho perros tratados con la viroterapia intratumoral superó el MST descrito para cada tipo de tumor con el protocolo de tratamiento estándar (quimioterapia) (3,26,159).

Los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma de sacos anales (*Apocrine Gland Anal Sac Adenocarcinoma*, AGASACA) en estadio 3 podrían ser tratados con un protocolo combinado de quimioterapia, pero su eficacia ha sido debatida y el MST descrito es de siete meses (160). Algunos estudios consideran un poco controvertido el papel de la quimioterapia en esta patología que, aunque tradicionalmente se haya recomendado por el alto ratio de metástasis, muchos estudios no han podido demostrar su beneficio aplicado al tiempo de supervivencia (161,162). Además, hay que tener en cuenta que la presencia de metástasis en el momento del diagnóstico es un factor pronóstico negativo y asociado siempre a una reducción del MST (163). La cirugía en los casos que es posible

(sin metástasis a distancia o metástasis localizada en los ganglios regionales), a pesar de sus complicaciones, se considera el tratamiento de elección, mostrando MST de 9,8-15 meses en casos de metástasis en ganglio (38,161,162). PSit01 presentaba un AGASACA con metástasis en linfonodos regionales, y metástasis a distancia en hígado y pulmón (estadio 4) en el momento de la primera inoculación, por lo que la cirugía no era una opción. El uso de la radioterapia como terapia única o complementaria a la cirugía ha mostrado buenos resultados, aunque acompañados de efectos adversos a nivel local (164). PSit01 tuvo un tiempo de supervivencia de 9,5 meses desde su inclusión en el estudio, lo que sugiere de forma preliminar que el tratamiento con ICOCV15 administrado localmente en una única lesión, podría representar una alternativa a la quimioterapia, con mejores resultados clínicos y sin efectos secundarios aparentes para estos pacientes.

El tratamiento de elección para los SCC resulta algo controvertido, y a pesar de que la opción quirúrgica es la que ofrece mejores resultados, incluso consiguiendo regresiones totales, dado que la cirugía es muy agresiva y altera gravemente el aspecto físico de la mascota en el caso de los SCC nasal u oral, los propietarios suelen rechazarla (21,22). La quimioterapia no ha mostrado grandes resultados en estos tipos de tumores, y la electroquimioterapia, aunque presenta resultados positivos, aún no se considera la terapia de referencia en perros por el bajo número de estudios publicados (165). Existen pocos estudios que hablen del tratamiento con quimioterapia en SCC nasal. El tratamiento con doxorubicina y carboplatino ofrece un MST de aproximadamente 5 meses para los tumores SCC nasales (21,41). Dos pacientes del estudio tenían un tumor de SCC muy invasivo en el plano nasal (PSit02 y Psit07), y ambos propietarios rechazaron la opción quirúrgica. En el caso de Psit07, se le practicó la eutanasia humanitaria por requerimiento de los propietarios a los 21 días de comenzar con el estudio. Psit02 presentó un MST de 11 meses y durante la estabilización de la enfermedad mejoraron notablemente los síntomas asociados al tumor (descarga nasal y ronquidos) lo que le permitió mejorar su calidad de vida y sin presentar ningún efecto adverso.

En el caso del perro con SCC oral no tonsilar (PSit04), los propietarios rechazaron la opción quirúrgica a pesar de ser el tratamiento con mejor pronóstico (19,166). Los tratamientos con quimioterapia reportan ratios de respuesta del 57% (167), la terapia de combinación (cirugía, quimioterapia y radioterapia) no está disponible actualmente para la mayor parte de los pacientes (168), y la electroquimioterapia aún necesita tiempo para ser un opción estable en medicina veterinaria (167). Tras la administración con ICOCV15, el perro con SCC oral redujo las molestias que presentaba al manipular la boca o al comer y no experimentó ningún efecto adverso durante el tratamiento. Además, obtuvo una RP con una reducción del 61,2% en los primeros tres meses tras el tratamiento, y actualmente el perro sigue vivo después tres años y tres meses de recibir la primera dosis, y 653 días desde la última dosis (en el momento de redacción de este

tratamiento). Este paciente recibió tres dosis; al inicio del tratamiento, a los 84 días y a los 185 días (101 días después de la segunda dosis). Los resultados obtenidos en los casos de SCC nasales y oral, sugieren que el tratamiento con ICOCAV15 mejora la supervivencia y el bienestar de los perros, sin generar efectos adversos (159), por lo que ICOCAV15 se propone como una alternativa terapéutica a explorar en profundidad, ya que evita las resecciones masivas agresivas. Todo ello respaldado por lo reportado en medicina humana ya que los tratamientos basados en la inmunoterapia para los SCC en cabeza y cuello se encuentran en un área de investigación activa (169,170).

A pesar de que los tumores primarios de pulmón presentan una incidencia entorno al 1% en medicina veterinaria (3), en nuestro estudio dos de los pacientes (PSit05 y PSit08) presentaban esta patología. La mayoría de los estudios coinciden en que los tratamientos de elección se basan en la cirugía y/o la radioterapia mostrando un MST, según clasificación y tamaño del tumor, de entre 3 y 32 meses (27,30,171). Los dos pacientes del estudio fueron clasificados como T3 (clasificación TNM) o estadio 3 (27), según los cuales se estima un MST de entre 3-6 meses. En el caso de PSit05 presentó una SD durante todo el tiempo que permaneció en el estudio, un MST de 11 meses y un aumento de la calidad de vida. En el caso de PSit08 presentó una SD durante los primeros meses del estudio y un MST de 10,5 meses de vida y, además, al igual que el anterior, un aumento de la calidad de vida. Teniendo en cuenta los casos en los que los tumores pulmonares no son operables, y la radioterapia no es una opción debido a su acceso limitado según áreas geográficas, ICOCAV15 ha mostrado proporcionar a los pacientes un aumento en la supervivencia global, y, sobre todo, asegurar la calidad de vida sin tener que padecer efectos adversos o duras recuperaciones tras la cirugía.

El adenocarcinoma nasal es un tumor de difícil tratamiento donde la cirugía además de no ser posible en la mayoría de los casos, está sujeta a complicaciones graves y pobre pronóstico, la quimioterapia no ha dado grandes resultados (MST alrededor de 4,7-7,7 meses) mientras que la radioterapia es el único tratamiento tradicional que ofrece alguna esperanza (MST 350-650 días), no obstante la radiación asociada en esta localización también se acompaña de efectos adversos graves (172). En el estudio se incluyó un perro con adenocarcinoma nasal (PSit06), que mantuvo una SD hasta 12 meses después de la primera dosis de ICOCAV15, (4 meses desde la segunda dosis) que el tumor mostró PD. No obstante, 12 meses más tarde (16 meses desde la última dosis) y sin ningún otro tratamiento, el paciente volvió a mostrar una SD. Actualmente, el perro sigue vivo tras 3 años y dos meses desde su inicio del tratamiento. Es posible que la infección viral se mantuviera a lo largo del tiempo en el tumor como lo demuestra la detección de OV 106 días después de la última inoculación. Este hallazgo coincide con otros estudios anteriores que han demostrado que adenovirus oncolíticos vehiculizados por células mesenquimales y administrados sistémicamente por vía intravenosa, pueden mantenerse en el tiempo en algunos órganos y tejidos del cuerpo (16). No se

pudo descartar un posible proceso de pseudoprogresión como responsable de la PD, como se ha documentado con otras inmunoterapias (153) sobre todo teniendo en cuenta respuesta posterior de SD demostrada. Aunque el fenómeno de la pseudoprogresión no está del todo claro, en el estudio histológico de los tumores diagnosticados como pseudoprogresión se ha podido observar que el aumento del tamaño podría deberse al aumento de la infiltración inmune, fundamentalmente representada por linfocitos T (173), y teniendo en cuenta que la infiltración de esta población celular está relacionada con mejor pronóstico (174), podría hipotetizarse que los pacientes con pseudoprogresión presentan mejores respuestas a las terapias a largo plazo, como en el caso de nuestro paciente. El caso de este paciente aporta evidencias de que el tratamiento con ICOCV15 una opción segura, que mejora la calidad de vida de los pacientes y que, en algunos casos como este, aumenta el tiempo de supervivencia frente a otras terapias que además conllevan riesgos y complicaciones.

El caso del paciente PSit09 presenta controversia a la hora de poder compararlo con otras terapias, ya que se administró el virus como tratamiento para una metástasis de un tumor primario (SSC mamario) ya extirpado pero que no trataron posteriormente. En cambio, un aspecto muy interesante de este paciente es que hemos podido detectar presencia de virus en una metástasis a distancia que se desarrolló a los dos meses de iniciar el tratamiento, tras 13 meses de la primera dosis inoculada en la masa tumoral de la pared costal. Esta metástasis no aumentó de tamaño durante el tiempo de vigilancia por lo que podría considerarse un efecto estabilizador del tratamiento mediante el conocido efecto abscopal, ya descrito en varias terapias antitumorales. Este efecto se ha reportado en el tratamiento con adenovirus intratumorales para el carcinoma de colon en humanos, entre otros (175,176). Aunque en nuestro caso sea necesario estudiar con mayor profundidad y detenimiento este fenómeno, sería una gran ventaja si se pudieran tratar varias masas tumorales, inoculando el virus únicamente en una de ellas, sobre todo para las metástasis que no presentan un fácil acceso. De hecho, una de las principales ventajas de la administración intravenosa, como en el caso de Celyvir, frente a la inoculación intratumoral de virus oncolítico, es la de poder alcanzar otras lesiones metastásicas al ser un tratamiento sistémico. En el caso de que se confirmara esta hipótesis, el tratamiento intratumoral podría alcanzar una mayor relevancia al no presentar esa desventaja frente a la administración IV.

Como posible opción de mejora, proponemos utilizar en futuros estudios terapias de combinación, ya que posiblemente podrían mejorar el PFS en pacientes con este tipo de tumores, teniendo en cuenta los resultados prometedores tanto en combinación con terapias tradicionales como la quimioterapia (177) o con otro tipo de inmunoterapia (88,102,178).

Aunque no hayamos obtenido correlaciones con el aumento de la supervivencia, otros estudios respaldan los beneficios terapéuticos de convertir un tumor poco inmunizado en inmunoestimulante.

La tendencia al aumento de los linfocitos CD8⁺ en sangre periférica, en seis de los siete perros, 14 días después de recibir la primera dosis fue notable. En un estudio con virus zika para el tratamiento de glioblastoma también reportaron el aumento de los linfocitos CD8⁺ apoyando la eficacia terapéutica del tratamiento (179). Los cambios en las demás subpoblaciones inmunes en sangre periférica fueron muy variables y no se pudieron extraer conclusiones. También se observó un aumento en los linfocitos B en sangre periférica en 6 de los ocho perros en los primeros 15 días en general tras la primera dosis. Aunque en nuestro caso no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos, estudios defienden que el aumento de los linfocitos B está asociado a mejoras en el pronóstico (173).

El MAC387 se ha identificado como un marcador de granulocitos, monocitos y macrófagos tisulares con un fenotipo M1, generalmente asociado a un TME proinflamatorio e inmunosupresor, que favorece una respuesta antitumoral (180,181). Los pacientes (PSit02 y PSit04), con una supervivencia global superior a la esperada con el tratamiento convencional mostraron un aumento de las células MAC387⁺ en el tejido tumoral primario tras la administración del OV, lo que sugiere que ICOCV15 podría influir en el TME, hipotetizando con que la infiltración de estas células podría mejorar la supervivencia, en cambio en otros estudios asocian esta infiltración con mal pronóstico (173,182). Además, se ha informado de un aumento de la infiltración de células CD3⁺ y CD20⁺ en ambos pacientes después de la segunda dosis. En el caso de los linfocitos T CD3⁺, el aumento de la infiltración tumoral está directamente asociado a aumento del tiempo libre de enfermedad como de supervivencia global (173). En los pacientes PSit02, PSit04 y PSit06 se observó un aumento de esta población celular y todos superaron el MST establecido con quimioterapia, en especial PSit04 y PSit06 con una OS de 3 años y 3 meses y 3 años y 2 meses respectivamente. Estos datos sugieren que ICOCV15 puede estimular el entorno inmunitario dentro del tumor, mejorando la MST. El aumento de la infiltración de linfocitos B CD20⁺ no se ha asociado a factores pronóstico (173). La terapia con virus oncolíticos sugiere ser capaz de convertir un microambiente poco inflamatorio en uno inmunoestimulante que mejora la eficacia del tratamiento y por tanto se asocia a aumentos en la esperanza de vida de los pacientes (183,184).

El marcador CD31⁺ se ha relacionado como factor pronóstico negativo en el tejido de algunos tumores por su relación directa con la neovascularización (128,129). Ninguno de nuestros pacientes mostró este marcador en el inicio del tratamiento.

Otros estudios en pacientes caninos también han investigado la infiltración de macrófagos proinflamatorios y linfocitos T y B en el tumor tras la inoculación de adenovirus como posible predicción de la respuesta al tratamiento en pacientes caninos (17,60), no obstante la medicina veterinaria necesita más estudios para confirmar estos resultados.

La respuesta inmune que provoca el virus no siempre es beneficiosa, ya que el propio sistema inmune podría detectar al OV y generar una respuesta antiviral, reduciendo con ello los beneficios de la terapia oncolítica (185). En un estudio reciente, un virus oncolítico se ha modificado genéticamente para expresar hialuronidasa y mostrar un dominio de unión a la albúmina, lo que le permite recubrirse de albúmina al entrar en la sangre y evitar a los anticuerpos neutralizantes (133). En nuestro estudio todos los animales mostraron un aumento de los anticuerpos anti-CAV tras las dosis de tratamiento, más pronunciado en la primera que en la segunda dosis, no obstante, no se pudo relacionar con la supervivencia ni con la respuesta clínica.

En el estudio de Celyvir, también observaron aumento de los anticuerpos sin relevancia en la eficacia clínica. En nuestro caso, uno de los pacientes (PSit04) no estaba vacunada y sus niveles de anti CAV2 detectados con ELISA eran 0 al inicio del tratamiento. Tras la primera dosis mostró la mayor respuesta del estudio (reducción del 61,2%), pudiendo hipotetizar que, al no presentar anticuerpos previos al tratamiento, la acción del virus no se vio reducida por la acción de los anticuerpos.

Este estudio piloto ha servido para mostrar que el tratamiento intratumoral con ICOCAV15 es seguro, más eficaz en varios casos que la terapia que actualmente se utiliza como primera línea de tratamiento, y que puede mejorar la calidad de vida y la tasa de supervivencia de los pacientes caninos, incluso en aquellos con metástasis a distancia. Dado que este estudio se realizó en un número reducido de pacientes, serán necesarios futuros estudios con una población mayor para estudiar con mayor profundidad los efectos del tratamiento con ICOCAV15.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- El tratamiento intratumoral con el adenovirus oncolítico ICOCAV15 ha demostrado ser un tratamiento seguro para carcinomas/adenocarcinomas caninos, al no mostrar efectos adversos, y mejorar la calidad de vida y el bienestar de los pacientes oncológicos caninos.
- ICOCAV15 aumenta las tasas de supervivencia y consigue una respuesta clínica del 100% tras la primera dosis, obteniendo un 25% de respuestas parciales y un 75% de estabilizaciones de la enfermedad.
- La administración intratumoral de ICOCAV15 induce una respuesta inmune, alterando el microambiente tumoral al aumentar el número de células inmunes infiltradas en el tumor, y genera un efecto abscopal sobre otros tumores no tratados.
- Este estudio ha tenido limitaciones en cuanto al número de pacientes y variabilidad de las características de estos y sus tumores.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Giuliano A. Companion Animal Model in Translational Oncology; Feline Oral Squamous Cell Carcinoma and Canine Oral Melanoma. *Biology (Basel)*. 2022;11(1).
2. Patil SS, Gentschev I, Nolte I, Ogilvie G, Szalay AA. Oncolytic virotherapy in veterinary medicine: Current status and future prospects for canine patients. *J Transl Med*. 2012;10(1):3.
3. Vail DM, Thamm DH, Liptak JM. *Small Animal Clinical Oncology*. Sixth. 2020.
4. Graf R, Pospischil A, Guscetti F, Meier D, Welle M, Dettwiler M. Cutaneous Tumors in Swiss Dogs: Retrospective Data From the Swiss Canine Cancer Registry, 2008–2013. *Vet Pathol*. 2018;55(6):809–20.
5. Grüntzig K, Graf R, Hässig M, Welle M, Meier D, Lott G, et al. The Swiss canine cancer registry: A retrospective study on the occurrence of tumours in dogs in Switzerland from 1955 to 2008. *J Comp Pathol*. 2015;152(2–3):161–71.
6. Merlo DF, Rossi L, Pellegrino C, Ceppi M, Cardellino U, Capurro C, et al. Cancer Incidence in Pet Dogs: Findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. 2008;976–84.
7. Aupperle-Iellbach H, Heidrich D, Kehl A, Conrad D, Brockmann M, Törner K, et al. KITLG Copy Number Germline Variations in Schnauzer Breeds and Their Relevance in Digital Squamous Cell Carcinoma in Black Giant Schnauzers. *Vet Sci*. 2023;
8. Pazzi P, Steenkamp G, Rixon AJ. Treatment of Canine Oral Melanomas: A Critical Review of the Literature. *Vet Sci*. 2022;9(5).
9. Castelló CM, de Carvalho MT, Bakuzis AF, Fonseca SG, Miguel MP. Local tumour nanoparticle thermal therapy: A promising immunomodulatory treatment for canine cancer. *Vet Comp Oncol*. 2022;20(4):752–66.
10. Dobson J, de Queiroz GF, Golding JP. Photodynamic therapy and diagnosis: Principles and comparative aspects. *Vet J*. 2018;233:8–18.
11. Nemeč A, Milevoj N, Lamprecht Tratar U, Serša G, Čemažar M, Tozon N. Electroporation-Based Treatments in Small Animal Veterinary Oral and Maxillofacial Oncology. *Front Vet Sci*. 2020;7(September).
12. Spugnini EP, Baldi A. Electrochemotherapy in Veterinary Oncology: State-of-the-Art and Perspectives. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract*. 2019;49(5):967–79.
13. Iseri T, Horikirazono H, Abe M, Itoh H, Sunahara H, Nemoto Y, et al. Outcomes of megavoltage radiotherapy for canine intranasal tumors and its relationship to clinical stages. *Open Vet J*. 2022;12(3):383–90.
14. Bergman PJ. Cancer Immunotherapies. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract*. 2019;49(5):881–902.
15. Addissie S, Klingemann H. Cellular immunotherapy of canine cancer. *Vet Sci*. 2018;5(4).
16. Moreno R, Fajardo CA, Farrera-Sal M, Perise-Barríos AJ, Morales-Molina A, Al-Zaher AA, et al. Enhanced antitumor efficacy of oncolytic adenovirus-loaded menstrual blood-derived mesenchymal stem cells in combination with peripheral blood mononuclear cells. *Mol Cancer Ther*. 2019;18(1):127–38.
17. Delgado-Bonet P, Tomeo-Martín BD, Delgado-Bonet B, Sardón-Ruiz D, Torrado-Carvajal A, Mateo I, et al. Intracranial Virotherapy for a Canine Hemangioma. *Int*

- J Mol Sci. 2022;23(19).
18. Riggs J, Adams VJ, Dobson JM, Murphy S, Ladlow JF. Outcomes following surgical excision or Surgical Excision Combined With Adjunctive, hypofractionated radiotherapy in dogs with oral squamous cell carcinoma or fibrosarcoma. *J Am Vet Med Assoc.* 2012;253(1):5–9.
 19. Sharma S, Boston SE, Skinner OT, Perry JA, Verstraete FJM, Lee DB, et al. Survival time of juvenile dogs with oral squamous cell carcinoma treated with surgery alone: A Veterinary Society of Surgical Oncology retrospective study. *Vet Surg.* 2021 May 1;
 20. MacLellan RH, Rawlinson JE, Rao S, Worley DR. Intraoperative and postoperative complications of partial maxillectomy for the treatment of oral tumors in dogs. 2018;252(12).
 21. Thomson M. Squamous Cell Carcinoma of the Nasal Planum in Cats and Dogs. *Clin Tech Small Anim Pract.* 2007;22(2):42–5.
 22. Ter Haar G, Hampel R. Combined Rostralateral Rhinotomy for Removal of Rostral Nasal Septum Squamous Cell Carcinoma: Long-Term Outcome in 10 Dogs. *Vet Surg.* 2015;44(7):843–51.
 23. Edgar MJ, Quina MT, Tano CA, Bloch CP. Outcome and complication rate of nasal planectomy reconstructed with direct mucocutaneous apposition. *Can Vet J.* 2022;63(4):386–90.
 24. Silva HDC, Dos Reys MP, Cassali GD, Souza FR, Horta RDS, de Sena BV, et al. Secretory carcinoma of the canine mammary gland with nodal and bone metastases: Case report. *Open Vet J.* 2022;12(4):502–7.
 25. Rasotto R, Berlato D, Goldschmidt MH, Zappulli V. Prognostic Significance of Canine Mammary Tumor Histologic Subtypes: An Observational Cohort Study of 229 Cases. *Vet Pathol.* 2017;54(4):571–8.
 26. Polton G, Finotello R, Sabattini S, Rossi F, Laganga P, Vasconi ME, et al. Survival analysis of dogs with advanced primary lung carcinoma treated by metronomic cyclophosphamide, piroxicam and thalidomide. *Vet Comp Oncol.* 2018;16(3):399–408.
 27. Lee BM, Clarke D, Watson M, Laver T. Retrospective evaluation of a modified human lung cancer stage classification in dogs with surgically excised primary pulmonary carcinomas. *Vet Comp Oncol.* 2020;18(4):590–8.
 28. McPhetridge JB, Scharf VF, Regier PJ, Toth D, Lorange M, Tremolada G, et al. Distribution of histopathologic types of primary pulmonary neoplasia in dogs and outcome of affected dogs: 340 cases (2010-2019). *J Am Vet Med Assoc.* 2022;260(2):234–43.
 29. Kanai E, Matsutani N, Hanawa R, Takagi S. Video-assisted thoracic surgery anatomical lobectomy for a primary lung tumor in a dog. *J Vet Med Sci.* 2019;(September).
 30. Withrow SJ, Vail DM. *Small Animal Clinical Oncology.* Fourth Edi. 2007.
 31. Polton GA, Brearley MJ. Clinical stage, therapy, and prognosis in canine anal sac gland carcinoma. *J Vet Intern Med.* 2007;21(2):274–80.
 32. Repasy AB, Selmic LE, Kisseberth WC. Canine Apocrine Gland Anal Sac Adenocarcinoma: A Review. *Top Companion Anim Med.* 2022;50:100682.
 33. Polton GA, Brearley MJ. Clinical Stage, Therapy, and Prognosis in Canine Anal Sac Gland Carcinoma. *J Vet Intern Med.* 2007;21(2):274–80.

34. McQuown B, Keyerleber MA, Rosen K, McEntee MC, Burgess KE. Treatment of advanced canine anal sac adenocarcinoma with hypofractionated radiation therapy: 77 cases (1999–2013). *Vet Comp Oncol.* 2017;15(3):840–51.
35. Meier V, Polton G, Cancedda S, Roos M, Laganga P, Emmerson T, et al. Outcome in dogs with advanced (stage 3b) anal sac gland carcinoma treated with surgery or hypofractionated radiation therapy. *Vet Comp Oncol.* 2017;15(3):1073–86.
36. Bennet PF, DeNicola DB, Bonney P, Glickman NW, Knapp DW. Canine Anal Sac Adenocarcinomas: Clinical Presentation and Response to Therapy. *J Vet Intern Med.* 2006;
37. Heaton CM, Fernandes AFA, Jark PC, Pan X. Evaluation of toceranib for treatment of apocrine gland anal sac adenocarcinoma in dogs. *J Vet Intern Med.* 2020;34(2):873–81.
38. Turek MM, Forrest LJ, Adams WM, Helfand SC, Vail DM. Postoperative radiotherapy and mitoxantrone for anal sac adenocarcinoma in the dog: 15 cases (1991-2001). *Vet Comp Oncol.* 2003;1(2):94–104.
39. Gorza LL, Oliveira AR, Porto MG, Santos VC, Hardt I, Maestri LFP, et al. Clinical, anatomopathological, and immunohistochemical findings of a transitional cell carcinoma from nasal cavity, frontal and ethmoidal sinus with meningoencephalic invasion in a dog. *Open Vet J.* 2021;11(1):1–5.
40. Cohn LA. Canine Nasal Disease: An Update. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract.* 2020;50(2):359–74.
41. Woodruff MJ, Heading KL, Bennett P. Canine intranasal tumours treated with alternating carboplatin and doxorubicin in conjunction with oral piroxicam: 29 cases. *Vet Comp Oncol.* 2019;17(1):42–8.
42. Abbott M, Aocnp Ò, Ustoyev Y. Cancer and the Immune System : The History and Background of Immunotherapy. 2019;000.
43. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011;144(5):646–74.
44. Van Barren N, Chambost H, Ferrant A, Michaux L, Ikeda H, Millard I, et al. A gene encoding an antigen recognized on a human melanoma by cytolytic T cells, is expressed in acute leukaemia cells. *Br J Haematol.* 1998;102(5):1376–9.
45. Bergman PJ. Immunotherapy in veterinary oncology. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract.* 2014;44(5):925–39.
46. Oiseth SJ, Aziz MS. Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead. *J Cancer Metastasis Treat.* 2017;3(10):250.
47. Chida K, Nakanishi K, Shomura H, Homma S, Hattori A, Kazui K, et al. Spontaneous regression of transverse colon cancer: a case report. *Surg Case Reports.* 2017;3(1):4–8.
48. Morales A, Eidinger D, Bruce AW. Intracavitary Bacillus Calmette Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol.* 1976;116(2):180–2.
49. Alfei F, Ho PC, Lo WL. DCision-making in tumors governs T cell anti-tumor immunity. *Oncogene.* 2021;40(34):5253–61.
50. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: From immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 2002;3(11):991–8.
51. Lasek W. Cancer immunoediting hypothesis: history, clinical implications and controversies. *Cent Eur J Immunol.* 2022;47(2):168–74.
52. Labani-Motlagh A, Ashja-Mahdavi M, Loskog A. The Tumor Microenvironment: A

- Milieu Hindering and Obstructing Antitumor Immune Responses. *Front Immunol.* 2020;11(May):1–22.
53. Hegde PS, Chen DS. Top 10 Challenges in Cancer Immunotherapy. *Immunity.* 2020;52(1):17–35.
 54. Van den Bulk J, Verdegaal EME, De Miranda NFCC. Cancer immunotherapy: broadening the scope of targetable tumours. *Open Biol.* 2018;8(6):1–10.
 55. Abbas A.K. LAH. *Cellular and Molecular Immunology.* fifth. SAUNDERS, editor. 2003.
 56. Kelly E, Russell SJ. History of oncolytic viruses: Genesis to genetic engineering. *Mol Ther.* 2007;15(4):651–9.
 57. Zhang Y, Zhang Z. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. *Cell Mol Immunol.* 2020;17(8):807–21.
 58. International Clinical Trials Registry Platform (ICTRP), World Health Organization. [cited 2022 May 29].
 59. Verganti S, Berlato D, Blackwood L, Amores-Fuster I, Polton GA, Elders R, et al. Use of Oncept melanoma vaccine in 69 canine oral malignant melanomas in the UK. *J Small Anim Pract.* 2017;58(1):10–6.
 60. Cejalvo T, Peris E-Barrios AJ, Del Portillo I, Laborda E, Rodriguez-Milla MA, Cubillo I, et al. Tumor Biology and Immunology Remission of Spontaneous Canine Tumors after Systemic Cellular Viroimmunotherapy. *Cancer Res.* 2018;
 61. Farkona S, Diamandis EP, Blasutig IM. Cancer immunotherapy: The beginning of the end of cancer? *BMC Med.* 2016;14(1):1–18.
 62. Klingemann H. Immunotherapy for Dogs: Still Running Behind Humans. *Front Immunol.* 2021;
 63. Zhang L, Zhang Z. Recharacterizing tumor-infiltrating lymphocytes by single-cell RNA sequencing. *Cancer Immunol Res.* 2019;7(7):1040–6.
 64. Kennedy LB, Salama AKS. A review of cancer immunotherapy toxicity. *CA Cancer J Clin.* 2020;70(2):86–104.
 65. Chhabra N, Kennedy J. A Review of Cancer Immunotherapy Toxicity II: Adoptive Cellular Therapies, Kinase Inhibitors, Monoclonal Antibodies, and Oncolytic Viruses. *J Med Toxicol.* 2022;18(1):43–55.
 66. Peng M, Mo Y, Wang Y, Wu P, Zhang Y, Xiong F, et al. Neoantigen vaccine: An emerging tumor immunotherapy. *Mol Cancer.* 2019;18(1):1–14.
 67. Conlon KC, Miljkovic MD, Waldmann TA. Cytokines in the Treatment of Cancer. 2019;39(1):6–21.
 68. Silk AW, Margolin K. Cytokine Therapy. Vol. 33, *Hematology/Oncology Clinics of North America.* Elsevier Inc; 2019. p. 261–74.
 69. Propper DJ, Balkwill FR. Harnessing cytokines and chemokines for cancer therapy. 2022;
 70. Finocchiaro LME, Spector AIM, Agnetti L, Arbe MF, Glikin GC. Combination of suicide and cytokine gene therapies as surgery adjuvant for canine mammary carcinoma. *Vet Sci.* 2018;5(3).
 71. Darvin P, Toor SM, Nair VS, Elkord E. Immune checkpoint inhibitors : recent progress and potential biomarkers. *Exp Mol Med.* 2018;1–11.
 72. Morad G, Helmink BA, Sharma P, Wargo JA. Hallmarks of response, resistance, and toxicity to immune checkpoint blockade. *Cell.* 2022;185(3):576.

73. Marable J, Ruiz D, Jaiswal AK, Bhattacharya R, Pantazes R, Agarwal P, et al. Nanobody-based CTLA4 inhibitors for immune checkpoint blockade therapy of canine cancer patients. *Sci Rep*. 2021;11(1):1–12.
74. Hinrichs CS, Rosenberg SA. Exploiting the curative potential of adoptive T-cell therapy for cancer. 2015;257(1):56–71.
75. Sakai O, Yamamoto H, Igase M, Mizuno T. Optimization of Culture Conditions for the Generation of Canine CD20-CAR-T Cells for Adoptive Immunotherapy. *In Vivo (Brooklyn)*. 2022;36(2):764–72.
76. Zhang S, Black RG, Kohli K, Hayes BJ, Miller C, Koehne A, et al. B7-H3 Specific CAR T Cells for the Naturally Occurring , Spontaneous Canine Sarcoma Model. 2022;(8):999–1009.
77. Atherton MJ, Rotolo A, Haran KP, Mason NJ. Case Report : Clinical and Serological Hallmarks of Cytokine Release Syndrome in a Canine B Cell Lymphoma Patient Treated With. 2022;9(July):1–8.
78. Saxena M, van der Burg SH, Melief CJM, Bhardwaj N. Therapeutic cancer vaccines. *Nat Rev Cancer*. 2021;21(6):360–78.
79. Thalmensi J, Pliquet E, Liard C, Chamel G, Kreuz C, Bestetti T, et al. Research paper a DNA telomerase vaccine for canine cancer immunotherapy. *Oncotarget*. 2019;10(36):3361–72.
80. Zhao Y, Liu Z, Li L, Wu J, Zhang H, Zhang H, et al. Oncolytic Adenovirus: Prospects for Cancer Immunotherapy. *Front Microbiol*. 2021;12(July):1–16.
81. Reale A, Calistri A. Giving Oncolytic Viruses a Free Ride : Carrier Cells for Oncolytic Virotherapy. *Pharmaceutics*. 2021;
82. Kooti W, Esmaeili Gouvarchin Ghaleh H, Farzanehpour M, Dorostkar R, Jalali Kondori B, Bolandian M. Oncolytic Viruses and Cancer, Do You Know the Main Mechanism? *Front Oncol*. 2021;11(December):1–11.
83. Feola S, Russo S, Ylösmäki E, Cerullo V. Oncolytic ImmunoViroTherapy: A long history of crosstalk between viruses and immune system for cancer treatment. *Pharmacol Ther*. 2021;236:108103.
84. Lichty BD, Breitbach CJ, Stojdl DF, Bell JC. Going viral with cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(8):559–67.
85. Lawler SE, Speranza MC, Cho CF, Chiocca EA. Oncolytic viruses in cancer treatment a review. *JAMA Oncol*. 2017;3(6):841–9.
86. Goradel NH, Mohajel N, Malekshahi ZV, Jahangiri S, Najafi M, Farhood B, et al. Oncolytic adenovirus: A tool for cancer therapy in combination with other therapeutic approaches. *J Cell Physiol*. 2019;234(6):8636–46.
87. Gujar S, Bell J, Diallo JS. SnapShot: Cancer Immunotherapy with Oncolytic Viruses. *Cell* . 2019;176(5):1240-1240.e1.
88. Bommareddy PK, Shettigar M, Kaufman HL. Integrating oncolytic viruses in combination cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* . 2018;18(8):498–513.
89. Evgin L, Kottke T, Tonne J, Thompson J, Huff AL, van Vloten J, et al. Oncolytic virus-mediated expansion of dual-specific CAR T cells improves efficacy against solid tumors in mice. *Sci Transl Med*. 2022;14(640):1–35.
90. Yang L, Gu X, Yu J, Ge S, Fan X. Oncolytic Virotherapy: From Bench to Bedside. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9(November):1–18.
91. Dharmadhikari N, Mehnert JM, Kaufman HL. Oncolytic Virus Immunotherapy for Melanoma. *Curr Treat Options Oncol*. 2015;16(3).

92. Andtbacka RHI, Kaufman HL, Collichio F, Amatruda T, Senzer N, Chesney J, et al. Talimogene laherparepvec improves durable response rate in patients with advanced melanoma. *J Clin Oncol.* 2015;33(25):2780–8.
93. Galanis E, Atherton PJ, Maurer MJ, Knutson KL, Dowdy SC, Cliby WA, et al. Oncolytic measles virus expressing the sodium iodide symporter to treat drug-resistant ovarian cancer. *Cancer Res.* 2015;75(1):22–30.
94. Angela Dispenzieri, Caili Tong, Betsy LaPlant, Martha Q. Lacy, Kristina Laumann D, Dingli, Yumei Zhou, Mark J. Federspiel, Morie A. Gertz, Suzanne Hayman FB, Michael O’Connor, Val J. Lowe, Kah-Whye Peng and SJR. Phase I Trial of Systemic Administration of Edmonston Strain of Measles Virus, Genetically Engineered to Express the Sodium Iodide Symporter in Patients with Recurrent or Refractory Multiple Myeloma. *Physiol Behav.* 2016;176(1):139–48.
95. Au GG, Beagley LG, Haley ES, Barry RD, Shafren DR. Oncolysis of malignant human melanoma tumors by Coxsackieviruses A13, A15 and A18. *Viol J.* 2011;8:11–6.
96. C Kemball C, Alirezaei M, Whitton JL. Type B coxsackviruses and their interactions with the innate and adaptive immune systems. 2010;1329–47.
97. Geisler A, Hazini A, Heimann L, Kurreck J, Fechner H. Coxsackievirus b3—its potential as an oncolytic virus. *Viruses.* 2021;13(5):1–22.
98. Robert H I Andtbacka , Brendan Curti , Gregory A Daniels , Sigrun Hallmeyer, Eric D Whitman , Jose Lutzky 6 Lynn E Spitler , Karl Zhou , Praveen K Bommareddy , Mark Grose , Meihua Wang , Cai Wu HLK. Clinical Responses of Oncolytic Coxsackievirus A21 (V937) in Patients With Unresectable Melanoma. *J Clin Oncol.* 2021;11(11):2670.
99. Brown MC, Gromeier M. Cytotoxic and immunogenic mechanisms of recombinant oncolytic poliovirus. *Curr Opin Virol.* 2015;13:81–5.
100. Wang P, Chen GZ. Recurrent Glioblastoma Treated with Recombinant Poliovirus. *Chin Med J (Engl).* 2018;131(21):2645–6.
101. Geletneky K, Nüesch JPF, Angelova A, Kiprianova I, Rommelaere J. Double-faceted mechanism of parvoviral oncosuppression. *Curr Opin Virol.* 2015;13:17–24.
102. Gebremeskel S, Nelson A, Walker B, Oliphant T, Lobert L, Mahoney D, et al. Natural killer T cell immunotherapy combined with oncolytic vesicular stomatitis virus or reovirus treatments differentially increases survival in mouse models of ovarian and breast cancer metastasis. *J Immunother Cancer.* 2021;9(3):1–11.
103. Zamarin D, Palese P. Oncolytic Newcastle disease virus for cancer therapy: old challenges and new directions. *Futur Sci Gr.* 2012;17.
104. Mantwill K, Klein FG, Wang D, Hindupur SV, Ehrenfeld M, Holm PS, et al. Concepts in oncolytic adenovirus therapy. *Int J Mol Sci.* 2021;22(19):1–21.
105. Packiriswamy N, Upreti D, Zhou Y, Khan R, Miller A, Diaz RM, et al. Oncolytic measles virus therapy enhances tumor antigen-specific T-cell responses in patients with multiple myeloma. *Leukemia .* 2020;
106. Li P, Wang J, Chen G, Zhang X, Lin D, Zhou Y, et al. Oncolytic activity of canine distemper virus in canine mammary tubular adenocarcinoma cells. *Vet Comp Oncol.* 2019;17(2):174–83.
107. Santos MR, Xavier PLP, Pires PRL, Rochetti AL, Rosim DF, Scagion GP, et al. Oncolytic effect of Newcastle disease virus is attributed to interferon regulation in canine mammary cancer cell lines. *Vet Comp Oncol.* 2021;19(3):593–601.
108. Igase M, Shousu K, Fujiki N, Sakurai M, Bonkobara M, Hwang CC, et al. Anti-

- tumour activity of oncolytic reovirus against canine histiocytic sarcoma cells. *Vet Comp Oncol*. 2019;17(2):184–93.
109. Béguin J, Foloppe J, Maurey C, Laloy E, Hortelano J, Nourtier V, et al. Preclinical Evaluation of the Oncolytic Vaccinia Virus TG6002 by Translational Research on Canine Breast Cancer. *Mol Ther - Oncolytics*. 2020;19(December):57–66.
 110. Cheng PH, Wechman SL, McMasters KM, Zhou HS. Oncolytic replication of E1b-deleted adenoviruses. *Viruses*. 2015;7(11):5767–79.
 111. BELL JA, HUEBNER RJ, PAFFENBARGER RS, ROWE WP, SUSKIND RG, WARD TG. Studies of adenoviruses (APC) in volunteers. *Am J Public Health Nations Health*. 1956;46(9):1130–46.
 112. Pereira HG, Huebner RJ, Ginsberg HS, Van Der Veen J. A short description of the adenovirus group. *Virology*. 1963;20(4):613–20.
 113. McConnell MJ, Imperiale MJ. Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. *Hum Gene Ther*. 2004;15(11):1022–33.
 114. Jambrina EL. Aumento de la potencia oncolítica de los adenovirus mediante el uso de virus adeno-asociados y generación de un adenovirus oncolítico canino como tratamiento para la clínica veterinaria y modelo para la clínica humana con adenovirus. Universidad autónoma de barcelona facultad de biociencias departamento; 2013.
 115. Baker AT, Aguirre-Hernández C, Halldén G, Parker AL. Designer oncolytic adenovirus: Coming of age. *Cancers (Basel)*. 2018;10(6):1–39.
 116. Yu W, Fang H. Clinical Trials with Oncolytic Adenovirus in China. *Curr Cancer Drug Targets*. 2007;7(2):141–8.
 117. Laborda E, Puig-Saus C, Rodríguez-García A, Moreno R, Cascalló M, Pastor J, et al. A pRb-responsive, RGD-modified, and hyaluronidase-armed canine oncolytic adenovirus for application in veterinary oncology. *Mol Ther*. 2014;22(5):986–98.
 118. Petrov I, Gentshev I, Vyalkova A, Elashry MI, Klymiuk MC, Arnhold S, et al. Canine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Mediated Oncolytic Therapy against Canine Soft Tissue Sarcoma. *Viruses*. 2020;12,750:1–13.
 119. Minev BR, Lander E, Feller JF, Berman M, Greenwood BM, Minev I, et al. First-in-human study of TK-positive oncolytic vaccinia virus delivered by adipose stromal vascular fraction cells. *J Transl Med*. 2019;17(1):1–15.
 120. Raja J, Ludwig JM, Gettinger SN, Schalper KA, Kim HS. Oncolytic virus immunotherapy: future prospects for oncology. *J Immunother Cancer*. 2018;6(1):1–13.
 121. Fukuhara H, Ino Y, Todo T. Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn. *Cancer Sci*. 2016;107(10):1373–9.
 122. Cervera-Carrascon V, Quixabeira DCA, Havunen R, Santos JM, Kutvonen E, Clubb JHA, et al. Comparison of Clinically Relevant Oncolytic Virus Platforms for Enhancing T Cell Therapy of Solid Tumors. *Mol Ther - Oncolytics*. 2020;17(June):47–60.
 123. Cascallo M, Alonso MM, Rojas JJ, Perez-Gimenez A, Fueyo J, Alemany R. Systemic toxicity-efficacy profile of ICOVIR-5, a potent and selective oncolytic adenovirus based on the pRB pathway. *Mol Ther*. 2007;15(9):1607–15.
 124. Yazbek KVB, Fantoni DT. Validity of a health-related quality-of-life scale for dogs with signs of pain secondary to cancer. *J Am Vet Med Assoc*. 2005;226(8):1354–8.

125. Nguyen SM, Thamm DH, Vail DM, London CA. Response evaluation criteria for solid tumours in dogs (v1.0): A Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG) consensus document. *Vet Comp Oncol.* 2015;13(3):176–83.
126. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):671–5.
127. LeBlanc AK, Atherton M, Bentley RT, Boudreau CE, Burton JH, Curran KM, et al. Veterinary Cooperative Oncology Group—Common Terminology Criteria for Adverse Events (VCOG-CTCAE v2) following investigational therapy in dogs and cats. *Vet Comp Oncol.* 2021;19(2):311–52.
128. Torres-Cabala C, Li-Ning-Tapia E, Hwu WJ. Pathology-based Biomarkers Useful for Clinical Decisions in Melanoma. *Arch Med Res.* 2020;51(8):827–38.
129. Bauman TM, Huang W, Lee MH, Abel EJ. Neovascularity as a prognostic marker in renal cell carcinoma. *Hum Pathol.* 2016;57:98–105.
130. Gaspar TB, Henriques J, Marconato L, Queiroga FL. The use of low-dose metronomic chemotherapy in dogs—insight into a modern cancer field. *Vet Comp Oncol.* 2018;16(1):2–11.
131. Johannes CM, Musser ML. Anorexia and the Cancer Patient. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract.* 2019;49(5):837–54.
132. Smith PAD, Burnside S, Helm JR, Morris JS. Owner perceptions of radiotherapy treatment for veterinary patients with cancer. *Vet Comp Oncol.* 2019;17(3):221–33.
133. Taefeshokr S, Parhizkar A, Hayati S, Mousapour M, Mahmoudpour A, Eleid L, et al. Cancer immunotherapy: Challenges and limitations. *Pathol - Res Pract.* 2022 Jan 1;229:153723.
134. Li K, Zhang A, Li X, Zhang H, Zhao L. Advances in clinical immunotherapy for gastric cancer. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 2021;1876(2):188615.
135. Geletneky K, Kiprianova I, Ayache A, Koch R, Herrero Y Calle M, Deleu L, et al. Regression of advanced rat and human gliomas by local or systemic treatment with oncolytic parvovirus H-1 in rat models. *Neuro Oncol.* 2010;12(8):804–14.
136. Bahreyni A, Ghorbani E, Fuji H, Ryzhikov M, Khazaei M, Erfani M, et al. Therapeutic potency of oncolytic virotherapy—induced cancer stem cells targeting in brain tumors, current status, and perspectives. *J Cell Biochem.* 2019;120(3):2766–73.
137. Nisar M, Paracha RZ, Adil S, Qureshi SN, Janjua HA. An Extensive Review on Preclinical and Clinical Trials of Oncolytic Viruses Therapy for Pancreatic Cancer. *Front Oncol.* 2022;12(May):1–23.
138. Worgall S, Wolff G, Falck-Pedersen E, Crystal RG. Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following in vivo administration. *Hum Gene Ther.* 1997;8(1):37–44.
139. Macedo N, Miller DM, Haq R, Kaufman HL. Clinical landscape of oncolytic virus research in 2020. *J Immunother Cancer.* 2020;8(2).
140. Goradel NH, Negahdari B, Ghorghanlu S, Jahangiri S, Arashkia A. Strategies for enhancing intratumoral spread of oncolytic adenoviruses. *Pharmacol Ther.* 2020;213(2):107586.
141. Treadwell JR, Lucas S, Tsou AY. Surgical checklists: A systematic review of impacts and implementation. *BMJ Qual Saf.* 2014;23(4):299–318.
142. Sellers D, Srinivas C, Djaiani G. Cardiovascular complications after non-cardiac surgery. *Anaesthesia.* 2018;73:34–42.

143. David V. Current Opinion in Infectious Diseases: Skin and soft tissue infections Evidence update on prevention of surgical site infection. *Electron Comput Text*. 2015;45–59.
144. Franco-Luzón L, González-Murillo Á, Alcántara-Sánchez C, García-García L, Tabasi M, Huertas AL, et al. Systemic oncolytic adenovirus delivered in mesenchymal carrier cells modulate tumor infiltrating immune cells and tumor microenvironment in mice with neuroblastoma. *Oncotarget*. 2020;11(4):347–61.
145. Nguyen T V, Crosby CM, Heller GJ, Mendel ZI, Barry ME, Barry MA. Oncolytic adenovirus Ad657 for systemic virotherapy against prostate cancer. *Oncolytic Virotherapy*. 2018;Volume 7:43–51.
146. Sánchez D, Cesarman-Maus G, Amador-Molina A, Lizano M. Oncolytic viruses for canine cancer treatment. *Cancers (Basel)*. 2018;10(11):1–24.
147. Smith BF, Curiel DT, Ternovoi V V., Borovjagin A V., Baker HJ, Cox N, et al. Administration of a conditionally replicative oncolytic canine adenovirus in normal dogs. *Cancer Biother Radiopharm*. 2006;21(6):601–6.
148. Zhou J, He Z, Ma S, Liu R. AST/ALT ratio as a significant predictor of the incidence risk of prostate cancer. *Cancer Med*. 2020;9(15):5672–7.
149. Zhang LX, Lv Y, Xu AM, Wang HZ. The prognostic significance of serum gamma-glutamyltransferase levels and AST/ALT in primary hepatic carcinoma. *BMC Cancer*. 2019;19(1):1–9.
150. Steffl JL, Bennett W, Olyaei AJ. The Old and New Methods of Assessing Kidney Function. *J Clin Pharmacol*. 2012 Jan 1 [cited 2022 Apr 20];52(S1):63S-71S.
151. Mato-Berciano A, Morgado S, Maliandi M V., Farrera-Sal M, Gimenez-Alejandro M, Ginestà MM, et al. Oncolytic adenovirus with hyaluronidase activity that evades neutralizing antibodies: VCN-11. *J Control Release*. 2021;332(November 2020):517–28.
152. Shahid K, Khalife M, Dabney R, Phan AT. Immunotherapy and targeted therapy—the new roadmap in cancer treatment. *Ann Transl Med*. 2019;7(20):595–595.
153. Frelaut M, du Rusquec P, de Moura A, Le Tourneau C, Borcoman E. Pseudoprogression and Hyperprogression as New Forms of Response to Immunotherapy. *BioDrugs*. 2020;34(4):463–76.
154. Ferté C, Marabelle A. iRECIST: A clarification of tumour response assessment in the immunotherapy era. *Eur J Cancer*. 2017;77:165–7.
155. Seymour L, Cancer C, Group T, Bogaerts J, Perrone A, Medicine T, et al. iRECIST: guidelines for response criteria for use in trials testing immunotherapeutics. *Lancet Oncol*. 2017;18(3):e143–52.
156. Ramon-Patino JL, Schmid S, Lau S, Seymour L, Gaudreau PO, Li JJN, et al. iRECIST and atypical patterns of response to immuno-oncology drugs. *J Immunother Cancer*. 2022;10(6):1–8.
157. Saleh R, Elkord E. Acquired resistance to cancer immunotherapy: Role of tumor-mediated immunosuppression. *Semin Cancer Biol*. 2020;65(July):13–27.
158. Bhatt DK, Chammas R, Daemen T. Resistance mechanisms influencing oncolytic virotherapy, a systematic analysis. *Vaccines*. 2021;9(10):1–14.
159. Rogers KS, Helman RG, Walker MA. Squamous cell carcinoma of the canine nasal planum: eight cases (1988-1994). *J Am Anim Hosp Assoc*. 1995 [cited 2022 Apr 21];31(5):373–8.
160. Wylleman B, Brancato L, Gorbasljeva I, Van Zwol E, Mori Da Cunha MGMC, Benoit

- J, et al. Tolerability of long-term temperature controlled whole-body thermal treatment in advanced cancer-bearing dogs. *Int J Hyperth*. 2021 [cited 2022 Jan 17];39(1):48–56.
161. Valenti P, Menicagli F, Baldi A, Barella G, Catalucci C, Attorri V, et al. Evaluation of electrochemotherapy in the management of apocrine gland anal sac adenocarcinomas in dogs: A retrospective study. *Open Vet J*. 2021;11(1):100–6.
 162. Wouda RM, Borrego J, Keuler NS, Stein T. Evaluation of adjuvant carboplatin chemotherapy in the management of surgically excised anal sac apocrine gland adenocarcinoma in dogs. Vol. 14, *Veterinary and Comparative Oncology*. 2016. p. 67–80.
 163. Repasy AB, Selmic LE, Kisseberth WC. Canine Apocrine Gland Anal Sac Adenocarcinoma: A Review. *Top Companion Anim Med*. 2022;100682.
 164. Williams C, Parys M, Handel I, Serra JC, Lawrence J. Minimal late radiation toxicity and transient early toxicity following postoperative definitive intent conformal radiation therapy (20 × 2.5 Gy) for canine apocrine gland anal sac adenocarcinoma. *Vet Radiol Ultrasound*. 2022;63(2):224–33.
 165. Dos Anjos DS, Bueno C, Magalhães LF, Magalhães GM, Mattos-Junior E, Pinto MMR, et al. Electrochemotherapy induces tumor regression and decreases the proliferative index in canine cutaneous squamous cell carcinoma. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–10.
 166. Mestrinho LA. Current Status and Future Perspectives in Canine Oral Squamous Cell Carcinoma. *Vet Pathol*. 2018;55(2):200–1.
 167. Simčič P, Lowe R, Granziera V, Pierini A, Torrigiani F, Lubas G. Electrochemotherapy in treatment of canine oral non-tonsillar squamous cell carcinoma. A case series report. *Vet Comp Oncol*. 2020;18(3):428–32.
 168. Supsavhad W, Dirksen WP, Martin CK, Rosol TJ. Animal models of head and neck squamous cell carcinoma. *Vet J*. 2016;210:7–16.
 169. Yokota T, Homma A, Kiyota N, Tahara M, Hanai N, Asakage T, et al. Immunotherapy for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Jpn J Clin Oncol*. 2020;50(10):1089–96.
 170. Rini BI, Battle D, Figlin RA, George DJ, Hammers H, Hutson T, et al. The society for immunotherapy of cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of advanced renal cell carcinoma (RCC). *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):1–31.
 171. Kawabe M, Kitajima Y, Murakami M, Iwasaki R, Goto S, Sakai H, et al. Hypofractionated radiotherapy in nine dogs with unresectable solitary lung adenocarcinoma. *Vet Radiol Ultrasound*. 2019;60(4):456–64.
 172. Mortier JR, Blackwood L. Treatment of nasal tumours in dogs: a review. *J Small Anim Pract*. 2020;61(7):404–15.
 173. Bruni D, Angell HK, Galon J. The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy. *Nat Rev Cancer*. 2020;20(11):662–80.
 174. Chen MY, Zeng YC. Pseudoprogression in lung cancer patients treated with immunotherapy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2022;169(August 2020):103531.
 175. Ribas A, Dummer R, Puzanov I, Vanderwalde A, Robert HI, Michielin O, et al. HHS Public Access. 2021;170(6):1109–19.
 176. Kakiuchi Y, Kuroda S, Kanaya N, Kumon K, Tsumura T, Hashimoto M, et al. Local oncolytic adenovirotherapy produces an abscopal effect via tumor-derived

- extracellular vesicles. *Mol Ther.* 2021;29(10):2920–30.
177. Mahalingam D, Wilkinson GA, Eng KH, Fields P, Raber P, Moseley JL, et al. Pembrolizumab in combination with the oncolytic virus pelareorep and chemotherapy in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma: A phase Ib study. *Clin Cancer Res.* 2020;26(1):71–81.
 178. Watanabe N, McKenna MK, Rosewell Shaw A, Suzuki M. Clinical CAR-T Cell and Oncolytic Virotherapy for Cancer Treatment. *Mol Ther.* 2021;29(2):505–20.
 179. Nair S, Mazzocchi L, Jash A, Govero J, Bais SS, Hu T, et al. Zika virus oncolytic activity requires CD8+ T cells and is boosted by immune checkpoint blockade. *JCI Insight.* 2021;6(1):1–15.
 180. Boutilier AJ, ElSawa SF. Macrophage polarization states in the tumor microenvironment. *Int J Mol Sci.* 2021;22(13).
 181. GA K, CA O, Malarkey DE MA, CR M, DA T, HL J, et al. Immunohistochemical evaluation of immune cell infiltration in canine gliomas. *Vet Pathol.* 2021;
 182. Chen Y, Song Y, Du W, Gong L, Chang H, Zou Z. Tumor-associated macrophages: An accomplice in solid tumor progression. *J Biomed Sci.* 2019;26(1):1–13.
 183. Rameshbabu S, Labadie BW, Argulian A, Patnaik A. Targeting innate immunity in cancer therapy. *Vaccines.* 2021;9(2):1–26.
 184. Ylösmäki E, Cerullo V. Design and application of oncolytic viruses for cancer immunotherapy. *Curr Opin Biotechnol.* 2020;65(1):25–36.
 185. Niemann J, Woller N, Brooks J, Fleischmann-Mundt B, Martin NT, Kloos A, et al. Molecular retargeting of antibodies converts immune defense against oncolytic viruses into cancer immunotherapy. *Nat Commun.* 2019;10(1):1–14.

ANEXOS

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Título del Proyecto: **Utilización de virus oncolíticos como agentes terapéuticos antitumorales.**

Responsable Clínico:

Centro: Servicio de Oncología, Hospital Clínico Veterinario - Universidad Alfonso X el Sabio (HCV-UAX).

DESCRIPCIÓN GENERAL:

Considerando que su mascota _____ padece un tumor maligno, le solicitamos su consentimiento para participar en un ensayo clínico terapéutico del que le informamos a continuación. Dicho ensayo ha obtenido la aprobación del Comité Ético de la UAX y se ha desarrollado atendiendo a las normas éticas y de bienestar animal. Antes de decidir si quiere participar o no, le rogamos lea detenidamente este documento que incluye la información sobre este proyecto. Puede formular todas las preguntas que le surjan y solicitar cualquier aclaración sobre cualquier aspecto del mismo.

PROPÓSITO DEL ESTUDIO: Evaluar la eficacia terapéutica de un modelo de virus oncolítico.

PROCEDIMIENTO:

Los pacientes candidatos al ensayo terapéutico serán atendidos por los responsables del Servicio de Oncología del HCV-UAX.

La metodología del estudio comprende:

- 1) Diagnóstico del tipo y extensión de la neoplasia: se determinará el tipo de tumor mediante estudios histológicos y se realizará el estadio del tumor (clasificación TNM) en función de los resultados de la exploración física y de los estudios complementarios por imagen pertinentes (radiografía, ecografía, tomografía computerizada, análisis sanguíneos).
- 2) Hemograma, bioquímica básica y pruebas de coagulación pre-administración del tratamiento. Una muestra de sangre pre-administración se guardará para estudios biológicos posteriores.
- 3) Tratamiento intratumoral de un virus oncolítico en la que seguirán los siguientes pasos:
 - 3.1) Se tomará una muestra del tumor para posterior caracterización biológica y gradación histopatológica del mismo.
 - 3.2) Inoculación del virus oncolítico, denominado ICOCAV. ICOCAV es un virus replicativo condicional con propiedades oncolíticas.
- 4) Monitorización del paciente postadministración: el primer día después de la administración, el paciente será sometido a vigilancia en el área de hospitalización durante un mínimo de 6- 12 horas, con controles específicos de temperatura y constantes vitales cada hora en las primeras 6 horas postadministración y cada 2 horas en las 6 siguientes. En estos tiempos, se tomarán muestras de sangre y de orina para estudios biológicos posteriores.
- 5) Seguimiento del paciente siempre por personal del Servicio de Oncología del HCV-UAX. Semanalmente durante cuatro semanas después de la administración del virus se realizarán las visitas de seguimiento (los días 7, 14, 21 y 28), se tomará una muestra de sangre para estudios biológicos posteriores.
- 6) Al final del tratamiento se tomará una muestra del tumor para posterior caracterización biológica y gradación histopatológica del mismo. Se procederá a un estudio de eficacia realizando un nuevo estadio tumoral (clasificación

TNM, basada en los datos de la exploración física y los estudios por imagen pertinentes) para determinar el tipo de respuesta, definida como respuesta completa (desaparición de todo signo de tumor), respuesta parcial (disminución del volumen tumoral en más de un 50%), enfermedad estable (disminución del volumen tumoral menor del 50% sin aparición de nuevas lesiones) o enfermedad progresiva (crecimiento del volumen tumoral o aparición de nuevas lesiones)

7) El propietario se compromete a ceder el cadáver del paciente tras su fallecimiento durante el tratamiento o después del mismo. En la necropsia se tomarán muestras biológicas para estudios posteriores. El propietario será el responsable de tomar la decisión de la eutanasia del paciente en caso necesario.

EFFECTOS BENEFICIOSOS/ADVERSOS DEL TRATAMIENTO

Este tratamiento es de uso experimental en perros, lo que implica que los efectos del mismo no son totalmente conocidos. **La aceptación de la inclusión en este estudio requiere que los propietarios de las mascotas entiendan que la administración de este tratamiento no asegura el control de la enfermedad tumoral, por lo que su mascota podría no mejorar o, incluso, empeorar durante el tratamiento; asimismo, podría suponer efectos adversos de naturaleza desconocida. Si se produjesen dichos efectos secundarios, serán tratados sin coste adicional para el propietario.**

La participación en este estudio supone la aceptación de que se han presentado otras alternativas terapéuticas (quimioterapia, radioterapia o cirugía convencional) que han sido descartadas por falta de evidencia científica en su efectividad, posibilidades económicas o por criterios personales de los propietarios de la mascota.

TRATAMIENTO DE LOS DATOS Y CONFIDENCIALIDAD

Se solicita su consentimiento para la utilización de los datos clínicos y de las muestras biológicas de su mascota para el desarrollo de este proyecto. Todos estos parámetros serán tratados con confidencialidad dentro de la normativa ética y científica. Los resultados de este estudio podrán ser comunicados en reuniones científicas, congresos médicos y publicaciones científicas, manteniendo una estricta confidencialidad sobre la identidad de su mascota y de sus propietarios.

COMPROMISO DE LOS PROPIETARIOS

Los propietarios que acepten que su mascota sea tratada en este proyecto se comprometen a cumplir la metodología del estudio, lo que incluye:

1. Acudir a las visitas programadas.
2. Aceptar la realización de las pruebas que se prescriban.
3. Seguir en su domicilio las pautas marcadas por el equipo clínico, no administrando ningún tratamiento no prescrito por el mismo.
4. Ceder el cadáver al HCVUAX en caso de fallecimiento del paciente, bien como consecuencia de la enfermedad tumoral, bien como consecuencia del tratamiento, bien por cualquier otra causa, independientemente del momento en que se produzca.

DURACIÓN DEL CONSENTIMIENTO: Esta autorización durará hasta el final del proyecto.

CONSENTIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DEL ENSAYO CLÍNICO

RESPONSABLE CLÍNICO:

TÍTULO DEL PROYECTO: Utilización de virus oncolíticos como agentes terapéuticos antitumorales.

Yo, con DNI..... y domicilio en propietario de, especie canina, raza, de años de edad, con número de identificación y nº de historia clínica declaro que he leído la Hoja de Información al Paciente, de la que se me ha entregado una copia. Se me han explicado las características del estudio, así como los posibles beneficios y riesgos que puedo esperar y las previsiones sobre el tratamiento de datos y muestras. Habiendo recibido suficiente información sobre el estudio, comprendo los compromisos que asumo y los acepto expresamente. Por ello, firmo este consentimiento informado para MANIFESTAR MI DESEO DE PARTICIPAR EN ESTE ENSAYO CLÍNICO.

Nombre del propietario:

DNI

Firma:

En Villanueva de la Cañana, a _____ de _____ de 2019

Nombre del Responsable Clínico:

DNI:

Firma:

En Villanueva de la Cañana, a _____ de _____ de 2019

Anexo 2. Consentimiento informado del Área de comunicación

ICOCAV PSit_Consentimiento comunicación v04.2019

CONSENTIMIENTO PARA EL ÁREA DE COMUNICACIÓN

El Hospital Clínico Veterinario Alfonso X el Sabio es un centro universitario y de referencia, donde no sólo intentamos mejorar el bienestar animal sino que además nos preocupamos por la formación de nuestros alumnos, la investigación de nuevos procedimientos médicos y quirúrgicos y la divulgación de contenido científico para compañeros veterinarios.

En el hospital queremos hacer llegar, a través de las redes sociales, información e imágenes de calidad a los amantes de los animales, alumnos y veterinarios referentes.

Por todo esto, y para cumplir lo establecido en la ley orgánica de protección de datos de carácter personal (LOPD), le pedimos que lea con detenimiento los siguientes apartados y nos de su autorización:

Autorizo al equipo del Hospital Clínico Veterinario Alfonso X el Sabio, a utilizar las pruebas complementarias (rayos x, ecografías, analíticas, etc.) y los datos obtenidos de estas, así como las imágenes de mi perro para divulgación profesional de contenido científico y formativo, respetando siempre la integridad moral del paciente y del propietario.

Autorizo al equipo del Hospital Clínico Veterinario Alfonso X el Sabio a obtener imágenes o vídeos de mi perro y hacer uso de ellas en la red, blog y redes sociales, respetando siempre la integridad moral del paciente y del propietario.

En el supuesto que usted acuda remitido al hospital por otra clínica veterinaria:

Autorizo al equipo del Hospital Clínico Veterinario Alfonso X el Sabio a enviar un informe clínico de mi perro así como las pruebas complementarias que se soliciten por dicha clínica.

Yo, con DNI....., propietario de , especie canina, declaro que he leído el consentimiento para el área de comunicación. Por ello, firmo este consentimiento informado para **MANIFESTAR MI AUTORIZACIÓN A LOS USOS ANTERIORMENTE INDICADOS DE LA INFORMACIÓN REFERENTE A MI PERRO.**

Firma Propietario

En Villanueva de la Cañada, a ____ de _____ de 2019

Anexo 3. Consentimiento Informado de Anestesia



Hospital Veterinario Universidad Alfonso X el Sabio

CONSENTIMIENTO INFORMADO ANESTESIA

D/ª

Con DNI/CIF nº:

Con domicilio en

Población:

Propietario del animal de nombre _____ especie _____

Raza _____ con fecha de nacimiento _____ sexo _____

Identificado con el nº de chip _____

Manifiesto que he recibido y entendido la información sobre el procedimiento anestésico (1) al que voluntariamente autorizo se someta a: _____

Teniendo conocimiento de los riesgos y posibles complicaciones de este procedimiento (2), así como la existencia de otras alternativas terapéuticas, sus ventajas e inconvenientes.

Autorizo al veterinario D/ª _____ colegiado en _____ con Nº de colegiado _____ del Colegio de Veterinarios de _____

A la realización del procedimiento anestésico (1), habiéndome explicado los riesgos y posibles complicaciones (2) del mismo, teniendo conocimiento que este procedimiento puede ser revocado en cualquier momento previo al inicio.

D/ª _____ como veterinario deseo hacer constar que he transmitido al propietario la información técnica necesaria, así como los posibles riesgos y complicaciones (2).

En Villanueva de la Cañada, 7 de mayo de 2020

Firma del cliente

Firma del veterinario

(1) Procedimiento anestésico: La elección del tipo de anestesia se determinará en función del tipo de cirugía, el estado de salud, edad, y el resultado de los exámenes complementarios. La elección final del protocolo anestésico/sedación es responsabilidad del veterinario que practica el procedimiento. Toda anestesia general programada necesita de una exploración previa y una analítica de sangre. En situaciones de urgencia, riesgo o necesidad sobrevenida, existe la posibilidad de cambiar la técnica anestésica prevista inicialmente por otra adaptada a las nuevas circunstancias, sin proporcionar al propietario información adicional.

(2) Complicaciones, riesgos: todo acto anestésico, incluso conducido con competencia y respetando los conocimientos científicos actuales conlleva un riesgo intrínseco pero asumible. Este riesgo depende tanto del estado de salud y edad del animal, como del proceso médico y/o quirúrgico por el que se produce el acto anestésico. Algunos animales especialmente nerviosos presentan un riesgo mayor ante la anestesia. Además, la conformación de algunas especies y razas puede aumentar el riesgo anestésico.

Así mismo, el uso de fármacos, o agentes anestésicos, maniobras de intubación, transfusiones de sangre y sus derivados, posturas exploratorias, y el propio procedimiento diagnóstico o quirúrgico pueden ocasionar excepcionalmente complicaciones imprevisibles, incluso la muerte, sin que existe negligencia por parte de los clínicos.

(3) Técnica Locoregional (especificar tipo de técnica):.....

Consentimiento (hacer cruz sobre la afirmación que proceda): (SI) (NO)

Firma de Propietario

(4) Riesgos adicionales elencar):.....

Firma de Propietario

(5) Consentimiento telefónico:

Firma Veterinario 1

Firma Veterinario 2

Anexo 4. Consentimiento Informado de Contraste Intravenoso



HOSPITAL CLINICO VETERINARIO UAX
UNIVERSIDAD PRIVADA DE MADRID S.A. A 78518529
Av. De la Universidad, 1 28691. Villanueva de la Cañada
Tf: 902 01 02 02 Fax: 91 810 52 62

Consentimiento Informado contraste intravenoso

Nombre propietario: con DNI:

Datos Mascota: , N° de historial con N° de Chip:

INFORMACIÓN GENERAL:

Si su mascota va a someterse a una tomografía computerizada debe saber que en ocasiones es necesaria la administración de un medio de contraste yodado intravenoso que permite valorar mejor algunos órganos internos y sus posibles lesiones. El veterinario decidirá si es necesaria o no la inyección de dicho contraste con el objetivo de comprender y diagnosticar mejor la enfermedad de su animal.

El contraste intravenoso presenta un alto margen de seguridad, pero raramente, como cualquier otro medicamento, puede producir efectos secundarios:

- Los más habituales son muy leves (náuseas, picores, pequeñas reacciones en la piel,...) y no requieren de tratamiento médico ya que son transitorios.
- De forma excepcional los efectos secundarios son graves o muy graves (éstos últimos son extraordinariamente raros) y consisten en alteraciones de tipo cardiovascular fundamentalmente, requiriendo de asistencia médica inmediata y pudiendo ocasionar la muerte del paciente.

Actualmente no existe ningún método eficaz para prevenir o predecir este tipo de efectos indeseables.

También es posible que al inyectar el contraste por la vena, se pueda producir en alguna ocasión un pequeño hematoma en la zona de punción, que se reabsorberá lentamente sin más complicaciones.

En cualquier caso debe saber que si ocurriera cualquiera de dichas complicaciones todos los medios técnicos para solucionarla están disponibles en nuestro centro.

Si tiene alguna duda pida más información al veterinario especialista.

CONSENTIMIENTO:

Manifiesto que he recibido y entendido la información y sobre el procedimiento diagnóstico arriba explicado al que autorizo realizar a mi mascota.

Teniendo conocimiento de los riesgos y posibles complicaciones de este procedimiento.

Autorizo al veterinario D/_____ con el número de colegiado _____ a realizar la inyección de contraste intravenoso.

DENEGACIÓN O REVOCACIÓN:

Tras ser informado sobre el procedimiento diagnóstico arriba explicado declaro que

Deniego / Acepto la realización de dicha prueba, haciéndome responsable de las consecuencias que puedan derivarse de esta decisión.

Villanueva de la Cañada, a

Fdo. Veterinario

Fdo.
Propietario

Anexo 5 Consentimiento informado de Procedimiento quirúrgico



HOSPITAL CLINICO VETERINARIO UAX
HOSPITAL CLINICO VETERINARIO UAX A78518529
Av. de la Universidad, 1 Villanueva de la Cañada
28691 MADRID
902 01 02 02 91 810 52 62
hospitalveterinario@uax.es

CONSENTIMIENTO INFORMADO CIRUGIA

D/ª
Con DNI/CIF nº
Con domicilio en
Población: -
Propietario del animal de nombre especie sexo
Raza con fecha de nacimiento
Identificado con el nº

Manifiesta que ha **recibido y entendido** la información sobre el procedimiento quirúrgico (1) al que voluntariamente autorizo se someta a: _____

Teniendo conocimiento de los riesgos y la posibilidad de complicaciones, secuelas y mortalidad de este procedimiento, así como el conocimiento de otras alternativas terapéuticas, sus ventajas e inconvenientes. Así mismo conoce la actividad docente de este Hospital, por lo que autoriza la colaboración de alumnos, bajo la supervisión de un veterinario, así como la toma de imágenes para fines docentes o científicos.

Igualmente conoce el presupuesto y se compromete a abonar al HCV de la UAX todos los gastos y honorarios que su animal origine como consecuencia de: pruebas diagnósticas/ tratamientos/hospitalización/intervenciones quirúrgicas y de la estancia del mismo, desde el día del ingreso hasta la fecha de alta.

El propietario conoce la normativa del Hospital que implica abonar una fianza previa y en caso de hospitalización, hacer entregas a cuenta cada 24 horas, comprometiéndose a abonar el resto de los cargos en el momento del alta del animal.

Así mismo, reconoce y acepta que los datos obtenidos durante el procedimiento, podrán ser utilizados para realizar estudios científicos de investigación.

Autoriza al veterinario D/ª _____ colegiado en _____ y con N° _____ del Hospital Clínico Veterinario UAX a la realización del procedimiento quirúrgico (1), teniendo conocimiento de que este procedimiento puede ser revocado en cualquier momento previo al inicio.

D/ª _____, colegiado en _____ y con N° _____ como veterinario hace constar que ha transmitido al propietario la información técnica necesaria, así como los posibles riesgos, complicaciones, secuelas y mortalidad de este procedimiento (2).

En Villanueva de la Cañada,

Firma Cliente

Firma Veterinario responsable

(1)Procedimiento quirurgico _____
(2)Complicaciones y riesgos frecuentes: anestésicos, mutilación de heridas, rechazo de suturas, etc.

Anexo 6. Consentimiento informado de Eutanasia



HOSPITAL CLINICO VETERINARIO UAX
UNIVERSIDAD PRIVADA DE MADRID S.A.A78518529

Av. de la Universidad, 1
TE: 902 01 02 02 Fax: 91 810 52 62

CONSENTIMIENTO INFORMADO DE EUTANASIA

D. MARTIN CARRASCO, CLARA con DNI/CIF nº 25601696-M y con domicilio en la C/ C CRISTO N37, - MADRID, distrito postal nº 49415, **AUTORIZA** en su calidad de **PROPIETARIO** del animal de especie Canina, con nombre SABANA, con Chip nº 98517000269445219076 e historia clínica nº 19076

Manifiesta que ha recibido y entendido la información sobre la eutanasia al que voluntariamente autoriza se someta a,

Manifiesto que no está incurso en ningún procedimiento legal, y que no ha intervenido en ninguna agresión en los últimos 20 días,

Autoriza al veterinario

D^a _____ Colegiado en _____ con nº: _____, del Hospital Clínico Veterinario de la UAX a la realización de eutanasia, (SI) / (NO), al procedimiento de necropsia (SI) / (NO), o cualquier otro procedimiento: _____, habiéndome explicado las opciones y el destino del cadáver:

- Retirada y cremación comunitaria
- Retirada y cremación individual
- Retirada voluntaria bajo responsabilidad del propietario
- _____

teniendo conocimiento de que este consentimiento puede ser revocado en cualquier momento previo al inicio.

D^a _____ como veterinario hace constar que he transmitido al propietario la información necesaria, así como las posibles opciones y destino del cadáver. El HCV UAX se hace responsable de dar de baja al animal en la base de datos de identificación correspondiente.

En Villanueva de la Cañada, a

Firma propietario / tenedor

Firma veterinario responsable

- (1) El tenedor presenta la autorización del propietario para el procedimiento de eutanasia.

Article

Safety and Efficacy of an Oncolytic Adenovirus as an Immunotherapy for Canine Cancer Patients

Clara Martín-Carrasco ^{1,†}, Pablo Delgado-Bonet ^{2,†} , Beatriz Davinia Tomeo-Martín ² , Josep Pastor ³,
Claudia de la Riva ⁴, Paula Palau-Concejo ², Noemí del Castillo ⁴ , Javier García-Castro ⁵ ,
and Ana Judith Perisé-Barrios ^{2,*} 

- ¹ Small Animal Surgery Service, Hospital Clínico Veterinario, Universidad Alfonso X el Sabio, 28691 Madrid, Spain; ccarrmar@uax.es
- ² Unidad de Investigación Biomédica (UIB-UAX), Universidad Alfonso X el Sabio, 28691 Madrid, Spain; pdelgbon@uax.es (P.D.-B.); btomemar@uax.es (B.D.T.-M.); paulapalau@hotmail.es (P.P.-C.)
- ³ Animal Medicine and Surgery Department, Fundació Hospital Clínic Veterinari, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès, Spain; josep.pastor@uab.cat
- ⁴ Oncology Service, Hospital Clínico Veterinario, Universidad Alfonso X el Sabio, 28691 Madrid, Spain; cdelafra@uax.es (C.d.l.R.); noemidelcastillom@gmail.com (N.d.C.)
- ⁵ Cellular Biotechnology Unit, Instituto de Salud Carlos III, 28220 Madrid, Spain; jgcastro@isciii.es
- * Correspondence: aperibar@uax.es; Tel.: +34-918-105-319
- † These authors contributed equally to this work.



Citation: Martín-Carrasco, C.; Delgado-Bonet, P.; Tomeo-Martín, B.D.; Pastor, J.; de la Riva, C.; Palau-Concejo, P.; del Castillo, N.; García-Castro, J.; Perisé-Barrios, A.J. Safety and Efficacy of an Oncolytic Adenovirus as an Immunotherapy for Canine Cancer Patients. *Vet. Sci.* **2022**, *9*, 327. <https://doi.org/10.3390/vetsci9070327>

Academic Editors: Ellen E. Sparger, Steven Dow and Sita Withers

Received: 13 May 2022

Accepted: 25 June 2022

Published: 28 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: The use of oncolytic virus is an innovative approach that has shown promising results as a treatment in oncology. Epithelial-derived tumors are the most frequent neoplasms in dogs, but gold standard therapies can be highly invasive procedures. Due to the accessible localization of these tumors, the intratumoral administration is feasible. Therefore, we propose to determine the safety and efficacy of intratumoral administration of oncolytic adenovirus ICOCAV15, in canine patients with epithelial-derived tumors. Eight dogs with carcinoma/adenocarcinoma were intratumorally treated with ICOCAV15. No clinically relevant changes were observed in the blood count, biochemistry and coagulation test analyzed during follow-up. The survival time of the 6/8 dogs exceeded the median survival time with chemotherapy, showing a partial response rate of 25% and 75% of stable disease. ICOCAV15 was detected in the target lesion by qPCR and immunohistochemistry. Also, some of the non-treated metastasis showed an infiltration of ICOCAV15 by immunohistochemistry. The immune populations were evaluated, and an increase of CD8+, MAC387+, CD3+ and CD20+ cells was reported in some of the patients after the inoculation. These results show that intratumoral ICOCAV15 is safe and well tolerated by dogs. Also, they suggest ICOCAV15 could be a new tool in veterinary oncology for accessible carcinomas/adenocarcinomas.

Abstract: The use of oncolytic viruses is an innovative approach to lyse tumor cells and induce antitumor immune responses. Eight dogs diagnosed with carcinoma/adenocarcinoma were intratumorally treated with ICOCAV15, an oncolytic canine adenovirus (CAV). To evaluate the treatment's safety, a blood count, biochemistry, and coagulation test were performed before treatment and during follow-up. Immune populations were analyzed by flow cytometry. Anti-adenovirus antibodies were also determined. The immune infiltration, vascularization, and viral presence in the tumor were determined by CD3, CD4, CD20, CD31 and CAV by immunohistochemistry. All the dogs maintained a good quality of life during follow-up, and some had increased median survival time when compared with dogs treated with chemotherapy. No treatment-related adverse effects were detected. The Response Evaluation Criteria In Solid Tumors criteria were also assessed: two patients showed a partial response and the rest showed stable disease at various times during the study. ICOCAV15 was detected inside the tumor during follow-up, and antiviral antibodies were detected in all patients. Furthermore, the tumor-infiltrating immune cells increased after viral administration. Therefore, we suggest that intratumorally administered ICOCAV15 could represent as a new tool for the treatment of canine carcinoma because it is safe, well-tolerated by dogs, and shows promising results.

Keywords: oncolytic virus; virotherapy; immunotherapy; ICOCV15; canine carcinoma

1. Introduction

During the last few years, the incidence of tumors in canine patients has been increasing, principally due to the increase in pets' lifespan, and tumors have become the primary cause of death and one of the greatest challenges in veterinary medicine [1]. Cutaneous and subcutaneous origins are the most frequent neoplasms, representing one-third of all diagnosed tumors in dogs [2]. Conventional therapies to treat canine tumors have certain disadvantages due to their low specificity, surgical limitations for non-accessible tumors [3], and the low availability of radiotherapy in some countries [4–7]. Due to these issues, immunotherapy is becoming one of the main pillars of anti-tumoral treatment research [8].

The influence of the immune system on the evolution of tumor growth has been evidenced in multiple reports [9–12]. Several cells present immunosurveillance functions, such as natural killer cells and macrophages, which detect and control cancerous cells in development, or dendritic cells, which activate CD8+ T cells in the tumor microenvironment (TME) [13,14]. This mechanism controls tumor progression when mutations in tumoral cells facilitate tumor growth and further promote their dissemination, evading the immune mechanisms activated in the patient [12,13,15]. These processes that facilitate tumor spread have been demonstrated in canine and human tumors, suggesting a new therapeutic route to treat cancer [11,13]. The ability of the immune system to recognize tumors has made it a field of interest for developing new therapeutic approaches in oncology. Immunotherapy typically addresses two main pathways: stimulating an immune response against the tumor and counteracting the inhibitory mechanisms of the TME that favor tumor growth [10,16,17]. Immunotherapy is a reality in human medicine, with more than 3270 ongoing clinical trials [18], and new therapeutic options have also shown promising results in veterinary medicine [19,20]. These therapies have fewer secondary effects and present a clear advantage in veterinary oncology, given that they are more tolerable by the patient than conventional therapies, allowing the animals to maintain their quality of life [17]. Although there are many varieties of immunotherapy, the use of oncolytic viruses (OVs) is an innovative approach that has become an interesting field of research, with several promising results as an oncological treatment [21–24].

OVs are genetically modified to have a selective replication in tumor cells, and several studies have identified various mechanisms that could induce a clinical response, including cellular lysis, antitumoral immunity, and vascular collapse [21,25–28]. The approval of Imlygic a few years ago by the US Food and Drug Administration and the European Medicines Agency for human patients with melanoma facilitated and promoted new investigations with various viral therapies. Several viruses are being used in current veterinary medicine for oncolytic therapy, such as adenovirus [20], measles virus [29], distemper virus [30], herpes simplex virus [31], Newcastle disease virus [32], reovirus [33], and vaccinia virus [34,35], among others. Although many viruses have been developed, oncolytic adenoviruses (Ads) are still the most commonly used for oncolytic virotherapy due to their infection efficacy, high titer production, safety, easy genetic modification, and well-studied replication characteristics [36].

The efficacy of Ads has been proven in several murine models, and further in veterinary and human clinical trials, with the very few adverse effects limited to mild flu-like symptoms, which can be more severe after systemic administration, and local reactions at the injection site [21,22,25,27,37]. In veterinary studies of local administration, one isolated case of coagulation disturbance has been reported [38]. Although these studies have shown promising results, all of them concur that one issue that needs to be improved in virotherapy is its reduced efficacy when administered systemically. To avoid the inactivation of the viral particles, several mechanisms have been proposed, such as the use of mesenchymal stem cells, liposomes, or intratumoral inoculation [10,20,35,39].

The most frequent tumors in dogs are cutaneous and subcutaneous, of epithelial origin, and the gold-standard therapies are either not available (radiotherapy) or are highly invasive procedures (surgery) [2,3,6]. The overall incidence of tumors determined to be of epithelial origin in dogs has been reported to be from 26 to 43%, in some cases being very aggressive and invasive tumors [1,2]. These types of tumors are relatively common in daily veterinary practice, and the intratumoral administration of OV can be easy to handle in this setting. The intratumoral use of OV in human literature for similar tumors has shown an 83% response rate with minimal adverse effects, implying it could be a feasible treatment for dogs with epithelial tumors [40]. The OV ICOCV15 is based on the canine wild-type adenovirus canine type 2 (CAV2), with an RGD motif inserted in the CAV2 knob. The modification of the endogenous E1a promoter, by the insertion of E2F-binding sites and the deletion of the pRB-binding domain (E1aD21), allows ICOCV15 to be a conditionally replicative virus that can finish the viral cycle in cells with a disrupted retinoblastoma pathway [37,38,41]. Our hypothesis was that intratumoral ICOCV15 can stimulate the immune environment inside the tumor to expand, produce tumor cell lysis, and improve the median survival time without causing adverse effects in dogs. Therefore, we proposed to determine the safety and efficacy of intratumoral inoculation with ICOCV15, a canine Ad (CAV) that replicates specifically in tumor cells, given that this treatment could improve outcomes for these oncologic patients.

2. Materials and Methods

2.1. Study Design

Eight canine patients diagnosed with carcinoma/adenocarcinoma were enrolled for intratumoral treatment with ICOCV15 at the Universidad Alfonso X el Sabio–Hospital Clínico Veterinario, Madrid, Spain (Table 1). The study was approved by the Ethics and Professional Integrity Committee of the Official College of Veterinarians of Madrid (NP 8384 in 2020). The inclusion criteria were the owners' rejection of the surgical procedure, inoperable tumors, no response to the standard chemotherapy protocols, absence of undercurrent disease, accessible lesions, and a docile character to allow follow-up without sedation. The virotherapy was authorized as compassionate treatment; therefore, a control group with healthy animals was not included in the study. The diagnosis procedure included a whole-body computed tomography (CT) with iodized contrast (IOHEXOL, Omnipaque at 2 mL/kg) to assess staging, with a tissue biopsy for histopathology analysis. To perform the treatment procedure, the canine patient was mildly sedated with acepromazine (0.03 mg/kg) and methadone (0.1 mg/kg) to perform CT, a tissue biopsy, and the intratumoral inoculation of ICOCV15. If the anesthesiologist required an induction of the patient for safety, thiopental (dose effect) and isoflurane (inhalant agent) were used. The ICOCV15 was kindly provided by Ramón Alemany Bonastre (IDIBELL-Institut Català d'Oncologia, l'Hospitalet de Llobregat, Spain). The veterinary clinician determined 3–5 quadrants of the visible tumor for intratumoral inoculation with ICOCV15 (10^7 i.u.) diluted in saline solution (500 µL total volume), using a 23G needle. For the cases in which the inoculation had to be guided by ultrasound, the administration of the virus was distributed throughout the line of the needle path. After the inoculation of the oncolytic CAV, the patients were closely monitored for six hours to detect any early adverse effects due to the therapy. Blood analysis, tumor measurements, and clinical anamnesis were evaluated on the seventh day, one month later, and then every two months (for the first year) to detect late adverse effects, to ensure the well-being of the patient and to evaluate the tumor response according to the Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (RECIST) criteria [42]. Tissue samples were obtained during each medical check-up for later analysis. A second dose was administered, with the owner's consent, at least 76 days after the first dose; we followed the same procedure as for the first inoculation. Lastly, 7/8 patients received the second dose (PSit07 had died) and 2/8 received a third dose (PSit04 after 185 days and PSit06 244 days after the first dose) to evaluate possible beneficial cumulative effects.

Table 1. Patients' characteristics.

Patient	Breed	Age (years)	Sex	Diagnosis	ICOCAV15 Dose	Survival Time (days)
PSit01	Miniature Schnauzer	13	Female	Apocrine Gland Anal Sac Adenocarcinoma	2	282
PSit02	Golden Retriever	11	Male	Squamous Cell Carcinoma (nasal plane)	2	332
PSit04	Mixed	7	Female	Squamous Cell Carcinoma (oral)	3	To date (2 years 7months)
PSit05	German Sheperd	10	Female	Pulmonary Carcinoma	2	332
PSit06	Mixed	11	Male	Nasal Adenocarcinoma	3	To date (2 years 7months)
PSit07	Labrador Retriever	13	Female	Squamous Cell Carcinoma (nasal plane)	1	21
PSit08	Mixed	10	Female	Pulmonary Carcinoma	2	319
PSit09	Cocker Spaniel	13	Female	Squamous Cell Carcinoma (rib wall)	2	389

2.2. Safety and Efficacy

To evaluate the possible adverse effects and any possible deterioration of health in the canine patients, we processed blood samples collected with heparin (to obtain plasma) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (for flow cytometry analysis) tubes. We evaluated hematocrit; hemoglobin; mean corpuscular volume; mean corpuscular hemoglobin concentration; mean corpuscular hemoglobin; red cell blood distribution width; reticulocytes; neutrophils; lymphocytes; monocytes; eosinophils; basophils; platelets; mean platelet volume; platelet distribution width; ions (Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , PO_4^{3-}); renal parameters (urea, blood urea nitrogen, creatinine); hepatic transaminases (alkaline phosphatase, aspartate aminotransferase [AST], alanine transaminase [ALT]); total proteins (albumin, globulin, and albumin/globulin ratio); coagulation times (time of prothrombin, partial time of activated thromboplastin, fibrinogen); basal glucose. In addition, at each check-up with the veterinarian, the owner completed a questionnaire (adapted from [43]) to evaluate the dog's quality of life. The questionnaire has 12 questions with responses scored from 0 to 3 (Table S1). The maximum score is 36, and scores lower than 20 indicate a poor quality of life. The tumor response was evaluated following RECIST criteria, with the baseline measurements taken before each inoculation. Complete response: disappearance of all target lesions, pathologic lymph nodes < 10 mm on the short axis; partial response (PR): at least 30% reduction in the sum of the target lesion diameters, taking as a reference the baseline sum; progressive disease (PD): either the appearance of new lesions or a >20% increase in the sum of the target lesion diameters, taking as a reference the smallest sum in the timeline between doses (the sum must also show an absolute increase of 5 mm); stable disease (SD): less than a 30% reduction or a 20% increase in the sum of the target lesion diameters, taking as a reference the smallest sum of the diameters during the study.

2.3. ICOCAV15 DNA Extraction and Quantification

Biopsies obtained at each check-up, as well as the tissues obtained at necropsies, were stored as dried pieces at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until processing. We disaggregated 10 to 30 mg

of each tissue, and extracted DNA with a specific commercial kit to isolate DNA from tissues (E.Z.N.A.[®] Tissue DNA kit; Omega biotech, Norcross, GA, USA), following the manufacturer's instructions. We analyzed the quantification and the purity of the DNA (A260/280 and A260/230) with a Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). A standard curve was performed with serial dilutions of ICOC-CAV15 from 0.4×10^6 viral particles (vp)/well to 4 vp/well. Triplicates of the purified DNA samples were analyzed by the quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) using the QuantStudio 3 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). We used the Premix Ex Taq (Clontech Laboratories Inc, Mountain View, CA, USA), primer forward (0.5 μ mol/L) 5'-TGTGGGCCTGTGTGATTCCT-3', primer reverse (0.5 μ mol/L) 5'-CCAGAATCAGCCTCAGTGCTC-3', and 10 pmol of Taqman probe FAM-CTCGAATCAGTGTGAGGCTCCGCA-TAMRA for 40 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. We analyzed the data obtained with QuantStudio 3 software (Applied Biosystem). The Ct number detected in each well was interpolated on the standard curve to quantify the copy number of ICOC-CAV15 in the samples, and we calculated the mean of the triplicates.

2.4. Flow Cytometry

We kept cryopreserved samples for flow cytometry at -80 °C until analysis. We thawed frozen samples in a water bath at 37 °C, then centrifuged and resuspended them in phosphate-buffered saline (PBS) with 2% fetal bovine serum (FBS). We added 50 μ L of cell suspension to 250 μ L of PBS with 2% FBS and incubated it at room temperature for 30 min with the selected antibody panel, then washed it twice, resuspended it in PBS, and analyzed it within one hour. Data analysis collection was performed with a Cytoflex S (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) and Cytoexpert software version 2.4.028 (Beckman Coulter). A total of 20,000 events were analyzed for each tube. Tube 1 contained 5 μ g of propidium iodide for dead cell exclusion, and the live cell population was gated by the side scatter cytogram versus the forward scatter cytogram. Tube 2 had the following antibody panel: CD21-PE (Bio-Rad, Hercules, CA, USA, clone CA2.1D6) to detect B cells; CD5-FITC (Bio-Rad, clone YKIX322.3) to detect T lymphocytes (helper and cytotoxic); CD56-APC (Sysmex, Barcelona, Spain, clone LT56) to detect a cell subset with the CD56+ phenotype. Tube 3 had CD8-PE (Bio Rad, clone YCATE55.9) to detect cytotoxic lymphocytes and CD4-FITC (Bio-Rad, clone YKIX302.9) to detect T helper lymphocytes. Tube 4 had CD14-PE (Bio-rad, clone Tük4) to detect monocytes and macrophages, and class II MHC-FITC (Bio-Rad, clone YKIX334.2) to detect antigen-presenting cells (including B cells) and also activated T lymphocytes.

2.5. Immunohistochemistry

The canine biopsies were fixed in 10% formalin for preservation, and they were embedded in paraffin. Sections of 5 mm were cut with a microtome and dewaxed, then rehydrated using an alcohol battery (xylol 2 \times 5 min, ethanol 100% 2 \times 5 min, ethanol 96% 1 \times 5 min, ethanol 70% 1 \times 5 min) for hematoxylin–eosin staining or immunostaining. To perform the immunostaining, a previous antigen retrieval with citrate buffer in a pressure cooker (3 min) was performed. Two washes with H₂O₂ (6%) of 10 min each (for CD31, one wash at 3%), followed by a PBS wash with 0.1% Triton was performed to inhibit the endogenous peroxidase. The immunostaining was performed with the Vector Laboratories VECTASTAIN R.T.U. Kit (Newark, CA, USA), using the kit's normal horse serum for blocking. We then incubated the sample overnight at 4 °C with the primary antibody (anti-CD3 (UCHT1 3 mg/mL; Dako, Santa Clara, CA, USA); anti-CD4 (OTI10B5 a 2 μ g/mL; Origene, Rockville, MD, USA); anti-S100A9 + calprotectin (MAC387 1 μ g/mL; Abcam, Cambridge, UK); polyclonal anti-CD20 (0.17 μ g/mL; Invitrogen, Waltham, MA, USA); polyclonal anti-Ad5 (1.25 μ g/mL, Abcam); anti-CD31 (JC70A 1:2, Dako)) and PBS + Triton 0.1% + bovine serum albumin 0.2%. After washing (PBS and Triton 0.1%), we incubated the samples with biotinylated anti-rabbit/mouse secondary antibody (VECTOR, R.T.U. VECTASTAIN Kit) for 30 min. We then incubated it for another 30 min with the kit's ABC reagent and used

the Vector Laboratories' DAB Peroxidase Substrate Kit to detect the staining. After this procedure, we performed counterstaining with hematoxylin (Harris Hematoxylin solution, PanReac AppliChem, Milan, Italy) and dehydration with alcohol (ethanol 50, 70, 96, 100%, and xylol) before mounting the preparations with dibutylphthalate polystyrene xylene (DPX) medium. Immunolabeling was quantified following a qualitative process by an experienced technician. The whole sample was evaluated using a NanoZoomer[®] slide scanner at the Instituto de Salud Carlos III over a range of sample sizes, from 2.5 × 0.9 to 23 × 12 mm. Four levels were established: negative (0% positive marking), mild positive (1–25%), moderate positive (26–55%), and high positive (>56%).

2.6. Virus-Binding Antibodies

We stored the plasma samples at –80 °C until analysis. The antibodies against canine adenovirus (α -CAV2) were determined by an enzyme-labeled dot assay (Canine VacciCheck, Antibody Test Kit; Eurovet Veterinaria, Madrid, Spain), following the manufacturer's instructions. We digitized the images and quantified the spot densities with ImageJ software [44]. We calculated arbitrary units as follows: (sample spot intensity–sample mean background intensity)–(positive reference spot intensity–positive reference spot mean background intensity).

2.7. Statistical Analyses

We graphed and analyzed the data with GraphPad Prism (GraphPad Software), then performed comparisons between the quantitative variables with a Student's *t*-test for samples with a normal distribution (* $p < 0.05$).

3. Results

3.1. Canine Patients, Safety, and Quality of Life

The study included eight oncologic canine patients diagnosed with adenocarcinomas ($n = 2$; PSit01 and PSit06) and carcinomas ($n = 6$). Various dog breeds were included: schnauzer ($n = 1$), labrador retriever ($n = 1$), golden retriever ($n = 1$), german shepherd ($n = 1$), cocker spaniel ($n = 1$) and mixed breed ($n = 3$); aged between 7 and 13 years (median 11 years), including females ($n = 6$) and males ($n = 2$) (Table 1).

Four patients had been previously treated with chemotherapy and were enrolled in the study when chemotherapy failed: PSit01, PSit02, and PSit07 were treated with palladia, and PSit05 was treated with cyclophosphamide. The rest of the patients' owners refused other therapies (including surgery when possible), and instead were treated with ICOCV15 as the first line of treatment. None of them returned to previous treatments after being enrolled in the study. Three patients left the study due to the owners' request.

No generalized change nor changes with clinical relevance were observed in any of the analyzed parameters in the peripheral blood; however, there were particular changes in a few dogs. The canine patients PSit01 (apocrine gland anal sac adenocarcinoma (AGASACA)) and PSit04 (non-tonsillar oral squamous cell carcinoma) had increased hepatic transaminases (Figure 1A). The clotting time was analyzed with blood samples obtained throughout the clinical study, and no clinically relevant alterations were detected (Figure 1B). In the patients PSit01 and PSit09 (breast squamous cell carcinoma (SCC) metastases on the rib wall), we detected an increase in creatinine at months 10 and 12, respectively (Figure 1C). Leukocytes increased after treatment in patient PSit08 (pulmonary adenocarcinoma), although high values were also demonstrated before treatment (Figure 1D).

During follow-up, no abnormalities were detected in the physical exploration by the veterinarian in any of the participants. The questionnaire, performed bimonthly to establish the behavior and quality of life of the patients treated with ICOCV15, showed that the two dogs diagnosed with pulmonary adenocarcinoma (PSit05 and PSit08) had an increase in the score given by the owners, indicating an improvement in its quality of life. PSit05 was evaluated over 10 months, showing 28, 29, 33, 34, 34 and 26 as average scores, and PSit08 was assessed for 6 months, with average scores of 26, 31, 34 and 33. PSit05, one month

after the last score, presented a severe worsening of its quality of life and was euthanized following the owner's request. However, the virotherapy did not affect the habits of the rest of the patients (six out of eight) (data not shown).

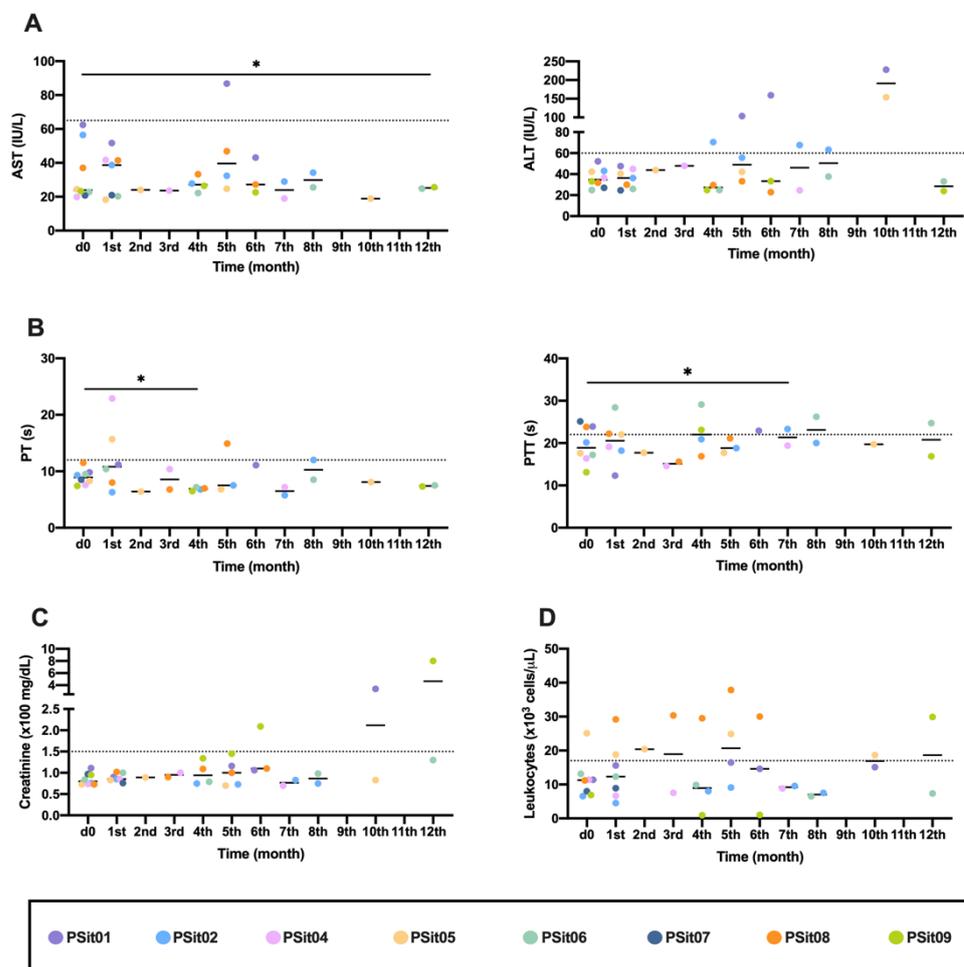


Figure 1. Hematological and biochemical analysis previously (d0) and during the first year of treatment. (A) Transaminases ALT and AST liver enzymes; (B) Clotting times, as PT and PTT measured in seconds (s); (C) Creatinine, renal parameters; (D) Peripheral blood leukocytes. Individual values of each patient (colored dots) and mean (-) are shown. ALT: alanine transaminase; AST: aspartate transaminase; PT: prothrombin time; PTT: partial thromboplastin time. Dashed line: limit of physiological range. The comparison group for statistical test was d0. * $p < 0.05$.

3.2. Outcome Assessment of Virotherapy

After the first inoculation, six dogs presented an SD and two dogs diagnosed with SCC showed PR in the first month and for four months (PSit04 and PSit09, respectively) (Figure 2). It should be mentioned that PSit09 developed a metastasis two months after treatment; nevertheless, the evaluation of the primary lesion showed a good local response from the intratumoral inoculation with ICOCV15. The patients PSit01 and PSit06 had a PR after 3 months of the initial stabilization, and were both diagnosed with adenocarcinoma. After the second inoculation of ICOCV15, PSit06 continued to respond to therapy with a PR for 4 months (using the measure taken before the second dose as baseline). A total of four out of seven dogs had an SD after the second dose, and two of them (PSit02 and PSit04) showed a PD after 2 and 3 months, respectively. Two of the patients had a PD at the next revisit, after one and seven months (PSit08 and PSit09, respectively) from the second dose. Lastly, two out of eight patients (PSit04 and PSit06) received a third dose of ICOCV15,

and in both of them an SD was reported to be maintained to date (more than two years after the first dose) (Figure 2).

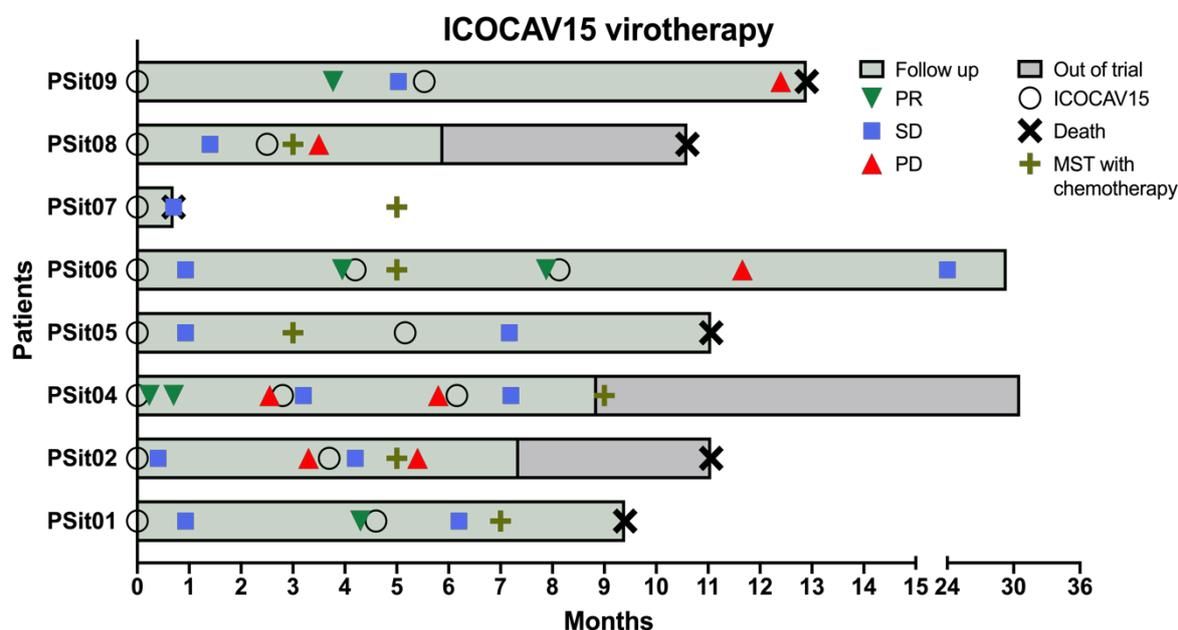


Figure 2. Median survival time (MST) and outcome assessment of virotherapy. The time each patient was enrolled in the study (green) or dropped out of the trial (gray), to represent overall survival, is shown. The inoculation of the virus (O) and the outcome assessment following RECIST criteria are represented only if there was a change of category reported. The baseline measurements were taken before each ICOCAV15 dose, and disease evolution was classified as partial response (PR), stable disease (SD), and progressive disease (PD). The patients' survival time (death; X) and the MST with standard of care for each tumor type (+) are shown.

The overall survival time of the six out of eight (except PSit07 and PSit09) dogs treated with the intratumoral ICOCAV15 was longer than 9 months after administration of treatment. It was compared with the median survival time (MST) according to the reported data in cited references for each case. An acute response, but not sustained, was observed in the patients with squamous cell carcinoma (PSit02 and PSit04). Both patients with adenocarcinoma (PSit01 and PSit06), one with pulmonary adenocarcinoma (PSit05), and the one with rib wall metastases from breast SCC (PSit09) presented a more sustained response over time (Figure 2). The patient PSit09 was maintained with analgesic treatment (tramadol 2 mg/kg twice a day) to control the pain caused by a new metastasis in the pelvis after the first dose of ICOCAV15. Given that there are no specific data for the metastasis of a tumor not previously treated, the MST could not be estimated for patient PSit09.

Two patients diagnosed with SCC showed a reduction of 22% (PSit02; baseline sum diameters (BSDs) from 4.5 cm to 3.5 cm) and 61.2% (PSit04; BSD from 6.7 cm to 2.6 cm) of the primary tumor until the third month after treatment (Figures 2 and 3), and patient PSit04 is still alive (2 years and 6 months after the first dose). Then, a progression of the disease was observed and the reinoculation of the virus did not reduce the tumor burden (Figures 2 and 3). Patient PSit06 (nasal adenocarcinoma) had a total reduction of 50.1% (BSD of 14 cm to 6.98 cm) of the primary tumor after the second dose of ICOCAV15. One year after the tumor progressed, but after one additional year without any treatment, the tumor of patient PSit06 was reduced by 50% when compared with its size at the beginning of the therapy (BSD from 14 to 7 cm) and the patient is still alive (2 years and 6 months after the first dose) with an SD (Figures 2 and 4). The patient with a rib wall metastasis from breast SCC (PSit09) achieved a reduction of 48.2% (BSD from 8.1 cm to 4.2 cm) in the sixth

month after the first inoculation; a second dose was inoculated once progression started, but a PD was maintained (Figure 4).



Figure 3. Images during follow-up from patients diagnosed with squamous cell carcinoma (SCC). SCC of patient PSit02 in the rostral region of the nasal plane and of patient PSit04 in the buccal region of the right maxillary gingiva. Photographs at medical checkup the day of the pre-treatment (d0) and several months (3rd, 6th, and 9th) after treatment are shown.

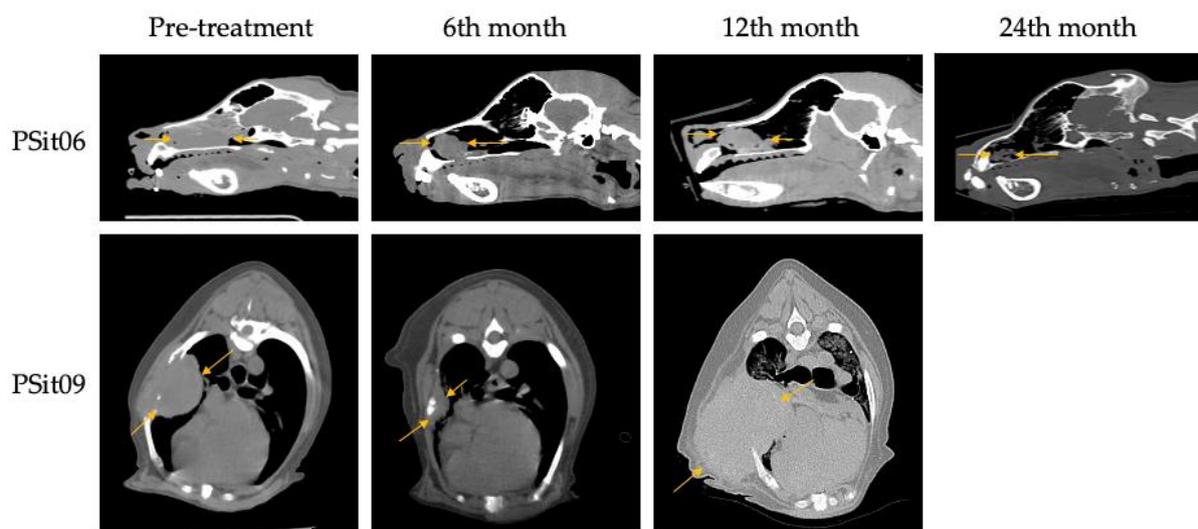


Figure 4. Computed tomography (CT) images during follow-up. Nasal adenocarcinoma of patient PSit06 in the nasal cavity and squamous cell carcinoma metastasis in the costal region of patient PSit09 are indicated by arrows. Sagittal slice CT images for patient PSit06 and cross-sectional images for patient PSit09 taken at their largest diameter on the initial day of treatment (d0), at six months (6th), at 12 months (12th), and at 24 months (24th) are shown.

3.3. Immune Response Evaluation

We have evaluated the immune response from various aspects. The results of flow cytometry tests showed an increase in cytotoxic lymphocytes (CD8+) in the peripheral blood of six out of seven patients after receiving the first dose (the exception was PSit05) (Figure S1).

Regarding cellular infiltration in tissue samples, in patients PSit02 (Figure 5), PSit04 and PSit06 (Figure 5), we observed that the infiltration of T and B lymphocytes (CD3+ or

CD20+) increased after the intratumoral inoculation of ICOCAV15. A summary of the results for immune cell infiltrates for each patient are described in Table S2. An increase in lymphocytes was noted after the first dose on day 28, and after the second dose at days 140 and 185 for PSit02 and PSit04, respectively (Table S2). PSit07 and PSit08 (at day 21 and day 42, respectively) showed a reduction in T cell and B cell infiltrates after the first dose (Table S2). PSit05 was the only patient that did not present B lymphocytes in the tumor in any of the samples evaluated. After ICOCAV15 inoculation, the infiltrating monocytes/macrophages increased in five out of eight patients. The highest number of infiltrating MAC387+ was detected after the second dose in PSit02 and PSit04, coinciding with the increase in B and T lymphocytes (Table S2). The endothelial marker CD31 showed that five out of eight dogs were negative when enrolled, and most of them (four out of five) presented low levels at some time during follow-up. Two dogs (PSit06 and PSit07) had reduced endothelial cells, reaching undetectable values at some follow-up time points. Neither moderate nor high amounts of this marker were found in any of the samples.

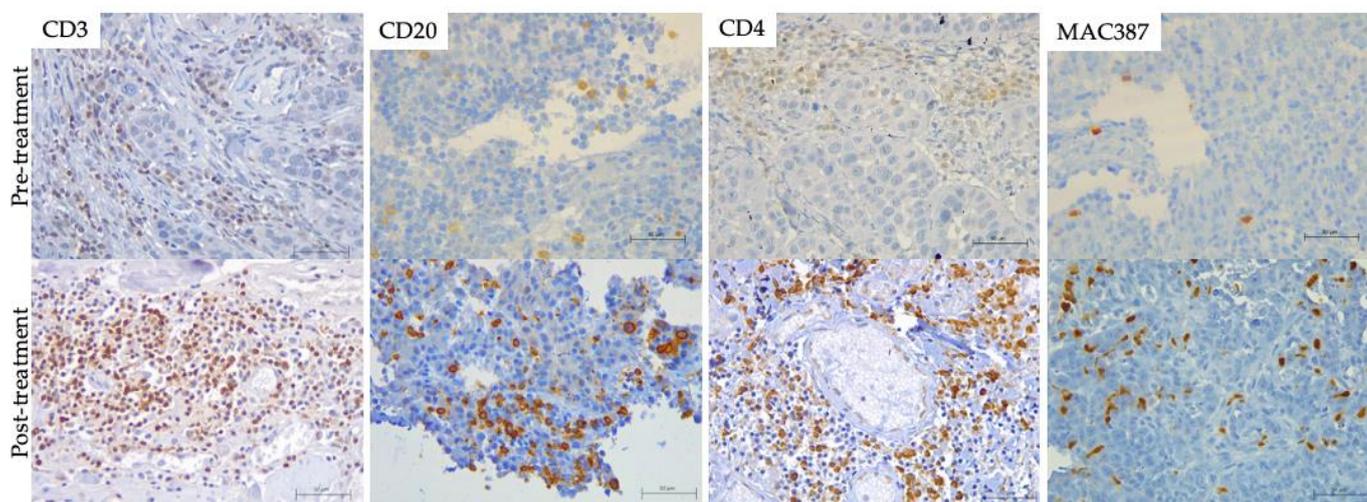


Figure 5. Tumor Infiltrated immune cells. (brown) on formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) pre-(**top**) and post-treatment (**bottom**) biopsies including hematoxylin counterstaining (blue). T lymphocytes (CD3) of PSit02 at d0 and d332, T helper lymphocytes (CD4) of PSit06 at d0 and d126, B lymphocytes (CD20) of PSit02 at d0 and d332, and monocytes/macrophages (MAC387) in PSit06 at d0 and d28 are shown. Scale bar: 50 μ m.

3.4. ICOCAV15 and Antiviral Response

Adenoviral DNA from ICOCAV15 was detected in tumor biopsies after the first and second inoculation in patient PSit04 by quantitative PCR at days 28 (d28; 828 vp/mg tissue) and 185 (d185; 8731 vp/mg tissue), respectively (Table S2). The presence of ICOCAV15 in treated tumors was confirmed by immunohistochemistry in biopsies (three out of four) during follow-up, and in all evaluated patients at necropsy (five out of five) (Figure 6A,B and Table S2). In some non-treated distant metastases from two dogs (PSit01 in the metastatic liver and PSit09 in the pelvic tumor) ICOCAV15 was also detected (Figure 6C and Table S2). The oncolytic virus was detected in the liver (three out of four) (Figure 6E) and spleen (three out of four) (Figure 6D) of post-mortem patient samples (Table S2). In the month following the first intratumoral inoculation of ICOCAV15, the anti-CAV2 antibodies in peripheral blood were increased in all the patients, despite most of them (seven out of eight) presenting antibodies before treatment. The antibodies increased by 20.7 arbitrary units (a.u.) seven days after the first dose (from 31.9 to 52.6) and increased 25.8 a.u. (from 60.7 to 86.5) after the second dose with the oncolytic virus (Figure 6F).

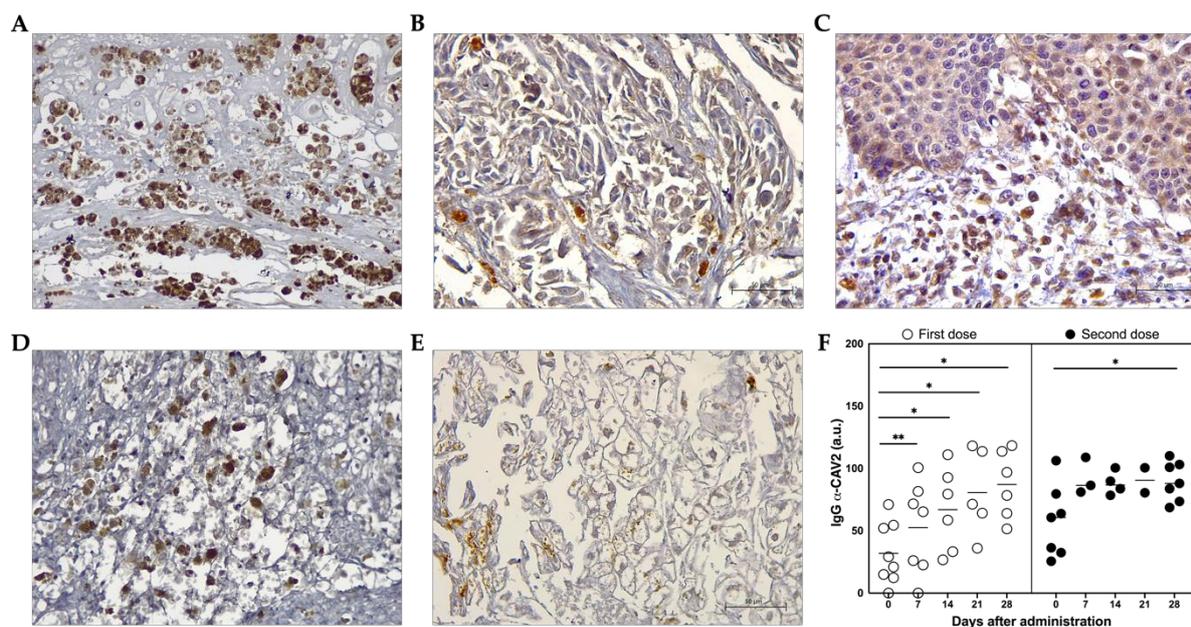


Figure 6. ICOC AV15 and antiviral response during follow-up. (A–E) Representative images of tissues showing adenovirus-positive cells (brown) assessed by immunohistochemistry. Scale bar: 50 μm . (A) PSit05 with pulmonary carcinoma 5.8 months after the last OV dose. (B) PSit07 with squamous cell carcinoma (SCC) 21 days after the last ICOC AV15 dose. (C) Distant metastasis of PSit09 (SCC rib wall) with ICOC AV15 (D) Spleen necropsies of PSit05 (pulmonary carcinoma). (E) Hepatic tissues of PSit07 (SCC nasal plate). (F) IgG α -CAV2 quantified by solid-phase ELISA in peripheral blood is shown. Arbitrary units (a.u.) from each patient (\circ and \bullet) and mean (-) showing anti-adenoviral immunoglobulins present in the serum of canine patients during ICOC AV15 treatment. The comparison group for statistical test was d0. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4. Discussion

The use of oncolytic Ads is a promising anti-cancer therapy, showing interesting results in human and veterinary clinical trials. Similar oncolytic Ads loaded into mesenchymal stem cells (Celyvir), used as a new therapeutic approach for canine tumors, have been reported to show a 74% response rate, supporting the hypothesis that CAV could have a beneficial effect on the quality of life of canine oncologic patients [20]. Even though Celyvir shows a good response toward various types of tumors, the direct intratumoral inoculation of the oncolytic Ad ICOC AV15 could improve the oncolytic effect on tumors [20]. It should be noted that, in previous assays, Celyvir had been used as a weekly treatment for several months. In the present study, a maximum of three doses of ICOC AV15 were administered (one dog with one dose, five dogs with two doses, and two dogs with three doses). We believed it would be more effective, given that 90% of the virus had been eliminated intravenously within the first 24 h by elements of the immune system, and even if cell-mediated delivery is a way to avoid such elimination, there is still a risk of it occurring [45,46]. The patients included in the study were only those that had accessible tumors, to avoid administration-associated risks.

The intravenous administration of Celyvir has not demonstrated any negative adverse effects in patients [20]. Intralesional administration ensures the arrival of the virus to the tumor without the animal's immune system attacking or destroying it before reaching its target. However, a similar study using a modified Ad administered intralesionally reported a case with coagulation deficiencies [38]. To evaluate the safety of ICOC AV15, a test of the dogs' quality of life, complete examinations, and complete blood tests were performed on our canine patients. In two patients (PSit01 and PSit04), we observed an elevation of the hepatic transaminases after treatment with ICOC AV15, which has not been previously described as a possible adverse effect. PSit04 had an elevated ALT, but the AST enzyme

was stable during the entire follow-up. Although ALT is predominant in liver tissue, this is not its only localization; therefore, if there is no increase in both enzymes, ALT should not be associated with liver damage [47]. Patient PSit01 presented a metastatic lesion in the hepatic parenchyma at the time the hepatic transaminases started to elevate. Tumor lesions in the liver have been associated with an elevation of these enzymes, so it is possible that the elevated AST and ALT in PSit01 did not indicate that ICOCV15 was causing damage to the healthy tissue [47,48]. The elevated creatinine detected in PSit01 and PSit09 was possibly associated with a renal infarction (diagnosed in PSit09) and could have been associated with a paraneoplastic hypercalcemia (PSit01) [7,49]. In addition, considering a previous study from other authors [37], the coagulation parameters were evaluated carefully and frequently, but our dogs did not show any clinically relevant alterations after treatment with ICOCV15.

The first dose of the oncolytic CAV showed a PR response rate of 25%, and the remaining 75% presented SD. Our results showed that patients with a first response to the treatment maintained a better long-term prognosis for at least 3 months. Furthermore, these patients had a better response rate when they were treated with a second dose of ICOCV15, even though the progression-free survival (PFS) time was shorter than after the first administration. This differential response to the subsequent doses is well known in immunotherapy, in which tumors can adapt and become resistant to treatment [50]. Combination therapies can be used, and they could possibly improve the PFS in patients with these types of tumors. The MST of the six out of eight dogs treated with the intratumoral virotherapy exceeded the survival time expected for these types of tumors treated with the standard of care protocol (chemotherapy) [2,51,52]. Patients diagnosed with stage III canine AGASACA could be treated with a combination protocol of chemotherapy, but its efficacy has been debated and the MST is approximately 7 months [53]. PSit01 presented an AGASACA with distant metastasis at the time of the first inoculation, and the survival time was 9.5 months, suggesting that adenoviral virotherapy could represent a new protocol with better clinical results and no apparent secondary effects for this type of tumor. Other patients in the study had a highly invasive SCC tumor in the nasal planum. The treatment of choice has been discussed in several articles; given that surgery is aggressive, owners typically reject it, and electrochemotherapy is not considered as the gold standard therapy in dogs. Due to its highly invasive behavior, the MST is approximately 5 months. Our findings suggest that treating these patients with ICOCV15 improves the survival and the well-being of dogs without the presence of adverse effects [51]. The patients diagnosed with a pulmonary adenocarcinoma, AGASACA, and adenocarcinoma in the nasal planum outlasted the survival time when compared to the MST reported with the standard of care [2]. Given that only four patients in the study met these criteria, more in-depth studies are indicated to confirm this correlation.

We documented a patient (PSit06) that maintained an SD after 29 months from the first treatment. This could have occurred because the viral infection was maintained over time in the tumor, as shown by the detection of OV several months after the last inoculation; furthermore, previous studies have shown that similar OV, when administered intravenously with carrier cells, can be maintained over time in some organs and tissues inside the body [54]. A possible pseudo-progression process could not be ruled out as being responsible for the PD, as has been documented with other immunotherapies [55].

The rising trend of CD8+ lymphocytes in six out of seven dogs 14 days after receiving the first dose was remarkable, given that it was probably due to the release of ICOCV15 from the tumor into the peripheral blood. This hypothesis appears feasible considering that virus has been detected in other organs and distant metastases that had not been treated. The changes in the other circulating subset frequencies were extremely variable and no conclusions could be drawn.

MAC387 has been identified as a marker for macrophages with an M1-like phenotype, usually associated with a pro-inflammatory and immunosuppressive TME, that favors an antitumoral response [56,57]. Patients with an overall MST higher than that expected

with conventional treatment (PSit02 and PSit04) showed an increase in MAC387+ cells in the primary tumor tissue after the administration of the OV, suggesting that ICOCV15 could have an effect on the TME, further suggesting that the infiltration of these cells could improve survival. In addition, an increase in the infiltration of CD3+ and CD20+ cells has been reported in both patients after the second dose. These data suggest that ICOCV15 can stimulate the immune environment within the tumor, improving the MST. Even though an increase in the CD3+ and CD20+ immune population within the tumor was reported, a correlation with overall survival time was not found. The infiltration of proinflammatory macrophages and T and B lymphocytes into the tumor after the inoculation of ICOCV15 should be further investigated as a possible prediction of treatment response in canine patients.

The assays performed in this study demonstrate the presence of ICOCV15 in distant metastases, which could indeed have an abscopal effect and improve the survival rate for canine patients with unreachable metastasis. In addition, no negative clinical adverse effects, and no negative alterations in the quality of life of patients were reported during the study. It should be noted that PSit09, which developed a distant metastasis with a pelvic tumor after the inoculation of the first dose, presented the virus inside the metastatic tissue after 389 days of treatment; therefore, this finding must be further studied to understand the abscopal effect of ICOCV15 related to the possible systemic dissemination of the virus. Given that this study was performed on a small number of patients, future studies with a larger population will be necessary to study the effects of treatment with ICOCV15.

5. Conclusions

ICOCV15 has been shown to be a possible treatment for some carcinomas/adenocarcinomas in veterinary medicine, without any adverse effects, and improving the wellbeing and survival rates in canine oncologic patients. Although the intratumoral inoculation of ICOCV15 could inhibit growth in distant metastases, this study was performed with a small number of patients; therefore, a more extensive and in-depth study should be performed to confirm these findings.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/vetsci9070327/s1>; Figure S1: Immune cell phenotype; Table S1: Quality of life questionnaire; Table S2: Tumor infiltrated by immune cells, endothelial cells, and oncolytic virus.

Author Contributions: Conceptualization, J.G.-C. and A.J.P.-B.; Data curation, C.M.-C., P.D.-B. and B.D.T.-M.; Funding acquisition, A.J.P.-B.; Methodology, C.M.-C., P.D.-B., B.D.T.-M., J.P., C.d.l.R. and P.P.-C.; Project administration, A.J.P.-B.; Supervision, J.G.-C. and A.J.P.-B.; Visualization, C.M.-C., C.d.l.R. and N.d.C.; Writing—original draft, C.M.-C. and P.D.-B.; Writing—review & editing, C.M.-C., P.D.-B., B.D.T.-M. and A.J.P.-B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Universidad Alfonso X el Sabio and by Santander Universidades-Fundación Universidad Alfonso X el Sabio (1.010.909 grant to A.J.P.-B.), whose support we gratefully acknowledge. B.D.T.-M. has a predoctoral fellow (PEJD-2019 PRE_BMD-16840) funded by Comunidad de Madrid.

Institutional Review Board Statement: The veterinary study was approved by the Ethics and Professional Integrity Committee of the Official College of Veterinarians of Madrid (Collegiate NP 8384 in 2020).

Informed Consent Statement: Written informed consent has been obtained from the owners of the patients to participate in the study.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We want to thank the owners of the canine patients, for their understanding and their active collaboration with this study. We thank Fernando Vázquez, LV, (Hospital Clínico Veterinario HCV-UAX, Madrid, Spain) that kindly allowed the use of the facilities to develop the

project. We thank David Sardón, LV, and Paloma Rey, Laboratory Technician for the pathological diagnosis of the tumor, Verónica Salazar, LV, For anesthetizing/sedating patients, when necessary, Alicia Barbero, LV, For imaging tests, and M^a Rosario Perlado, LV, PhD. for routine blood tests, all of them from different Services at HCV-UAX. ICOCV15 was kindly provided by Ramón Alemany Bonastre; (IDIBELL-Institut Català d'Oncologia, l'Hospitalet de Llobregat, Spain).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- Patil, S.S.; Gentshev, I.; Nolte, I.; Ogilvie, G.; Szalay, A.A. Oncolytic Virotherapy in Veterinary Medicine: Current Status and Future Prospects for Canine Patients. *J. Transl. Med.* **2012**, *10*, 3. [CrossRef] [PubMed]
- Vail, D.M.; Thamm, D.H.; Liptak, J.M. *Small Animal Clinical Oncology*, 6th ed.; Elsevier Saunders: Saint Louis, MO, US, 2020.
- Sharma, S.; Boston, S.E.; Skinner, O.T.; Perry, J.A.; Verstraete, F.J.M.; Lee, D.B.; Van Stee, L.L.L.; Thompson, C.; Boylan, M.; McKee, T.; et al. Survival Time of Juvenile Dogs with Oral Squamous Cell Carcinoma Treated with Surgery Alone: A Veterinary Society of Surgical Oncology Retrospective Study. *Vet. Surg.* **2021**. [CrossRef] [PubMed]
- Gaspar, T.B.; Henriques, J.; Marconato, L.; Queiroga, F.L. The Use of Low-Dose Metronomic Chemotherapy in Dogs—Insight into a Modern Cancer Field. *Vet. Comp. Oncol.* **2018**, *16*, 2–11. [CrossRef]
- Johannes, C.M.; Musser, M.L. Anorexia and the Cancer Patient. *Vet. Clin. N. Am.-Small Anim. Pract.* **2019**, *49*, 837–854. [CrossRef] [PubMed]
- Smith, P.A.D.; Burnside, S.; Helm, J.R.; Morris, J.S. Owner Perceptions of Radiotherapy Treatment for Veterinary Patients with Cancer. *Vet. Comp. Oncol.* **2019**, *17*, 221–233. [CrossRef] [PubMed]
- Meier, V.; Polton, G.; Cancedda, S.; Roos, M.; Laganga, P.; Emmerson, T.; Rohrer Bley, C. Outcome in Dogs with Advanced (Stage 3b) Anal Sac Gland Carcinoma Treated with Surgery or Hypofractionated Radiation Therapy. *Vet. Comp. Oncol.* **2017**, *15*, 1073–1086. [CrossRef]
- Shahid, K.; Khalife, M.; Dabney, R.; Phan, A.T. Immunotherapy and Targeted Therapy—The New Roadmap in Cancer Treatment. *Ann. Transl. Med.* **2019**, *7*, 595. [CrossRef]
- Chida, K.; Nakanishi, K.; Shomura, H.; Homma, S.; Hattori, A.; Kazui, K.; Taketomi, A. Spontaneous Regression of Transverse Colon Cancer: A Case Report. *Surg. Case Rep.* **2017**, *3*, 4–8. [CrossRef]
- Van Barren, N.; Chambost, H.; Ferrant, A.; Michaux, L.; Ikeda, H.; Millard, I.; Olive, D.; Boon, T.; Coulie, P.G. A Gene Encoding an Antigen Recognized on a Human Melanoma by Cytolytic T Cells, Is Expressed in Acute Leukaemia Cells. *Br. J. Haematol.* **1998**, *102*, 1376–1379. [CrossRef]
- Bergman, P.J. Immunotherapy in Veterinary Oncology. *Vet. Clin. N. Am.-Small Anim. Pract.* **2014**, *44*, 925–939. [CrossRef]
- Oiseth, S.J.; Aziz, M.S. Cancer Immunotherapy: A Brief Review of the History, Possibilities, and Challenges Ahead. *J. Cancer Metastasis Treat.* **2017**, *3*, 250. [CrossRef]
- Abbott, M.; Aocnp, Ö.; Ustoyev, Y. Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy. *Semin. Oncol. Nurs.* **2019**, *35*, 150923. [CrossRef] [PubMed]
- Dunn, G.P.; Bruce, A.T.; Ikeda, H.; Old, L.J.; Schreiber, R.D. Cancer Immunoeediting: From Immunosurveillance to Tumor Escape. *Nat. Immunol.* **2002**, *3*, 991–998. [CrossRef]
- Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. [CrossRef] [PubMed]
- Farkona, S.; Diamandis, E.P.; Blasutig, I.M. Cancer Immunotherapy: The Beginning of the End of Cancer? *BMC Med.* **2016**, *14*, 73. [CrossRef] [PubMed]
- Klingemann, H. Immunotherapy for Dogs: Still Running Behind Humans. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 665784. [CrossRef]
- International Clinical Trials Registry Platform (ICTRP), World Health Organization. Available online: <https://www.who.int/clinical-trials-registry-platform> (accessed on 29 May 2022).
- Verganti, S.; Berlato, D.; Blackwood, L.; Amores-Fuster, I.; Polton, G.A.; Elders, R.; Doyle, R.; Taylor, A.; Murphy, S. Use of Oncept Melanoma Vaccine in 69 Canine Oral Malignant Melanomas in the UK. *J. Small Anim. Pract.* **2017**, *58*, 10–16. [CrossRef]
- Cejalvo, T.; Perisé-Barrios, A.J.; Del Portillo, I.; Laborda, E.; Rodriguez-Milla, M.A.; Cubillo, I.; Azquez, F.V.; Sard On, D.; Ramirez, M.; Alemany, R.; et al. Tumor Biology and Immunology Remission of Spontaneous Canine Tumors after Systemic Cellular Viroimmunotherapy. *Cancer Res.* **2018**. [CrossRef]
- Zhao, Y.; Liu, Z.; Li, L.; Wu, J.; Zhang, H.; Zhang, H.; Lei, T.; Xu, B. Oncolytic Adenovirus: Prospects for Cancer Immunotherapy. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 1–16. [CrossRef]
- Reale, A.; Calistri, A. Giving Oncolytic Viruses a Free Ride: Carrier Cells for Oncolytic Virotherapy. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 2192. [CrossRef]
- Kooti, W.; Esmaeili Gouvarchin Ghaleh, H.; Farzanehpour, M.; Dorostkar, R.; Jalali Kondori, B.; Bolandian, M. Oncolytic Viruses and Cancer, Do You Know the Main Mechanism? *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 1–11. [CrossRef] [PubMed]
- Feola, S.; Russo, S.; Ylösmäki, E.; Cerullo, V. Oncolytic ImmunoViroTherapy: A Long History of Crosstalk between Viruses and Immune System for Cancer Treatment. *Pharmacol. Ther.* **2021**, *236*, 108103. [CrossRef] [PubMed]

25. Goradel, N.H.; Mohajel, N.; Malekshahi, Z.V.; Jahangiri, S.; Najafi, M.; Farhood, B.; Mortezaee, K.; Negahdari, B.; Arashkia, A. Oncolytic Adenovirus: A Tool for Cancer Therapy in Combination with Other Therapeutic Approaches. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 8636–8646. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Lichty, B.D.; Breitbach, C.J.; Stojdl, D.F.; Bell, J.C. Going Viral with Cancer Immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **2014**, *14*, 559–567. [[CrossRef](#)]
27. Lawler, S.E.; Speranza, M.C.; Cho, C.F.; Chiocca, E.A. Oncolytic Viruses in Cancer Treatment a Review. *JAMA Oncol.* **2017**, *3*, 841–849. [[CrossRef](#)]
28. Gujar, S.; Bell, J.; Diallo, J.S. SnapShot: Cancer Immunotherapy with Oncolytic Viruses. *Cell* **2019**, *176*, 1240–1240.e1. [[CrossRef](#)]
29. Iizuka, K.; Shoji, K.; Fujiyuki, T.; Moritoh, K.; Tamura, K.; Yoshida, A.; Sato, H.; Yoneda, M.; Asano, K.; Kai, C. Antitumor Activity of an Oncolytic Measles Virus against Canine Urinary Bladder Transitional Cell Carcinoma Cells. *Res. Vet. Sci.* **2020**, *133*, 313–317. [[CrossRef](#)]
30. Li, P.; Wang, J.; Chen, G.; Zhang, X.; Lin, D.; Zhou, Y.; Yu, Y.; Liu, W.; Zhang, D. Oncolytic Activity of Canine Distemper Virus in Canine Mammary Tubular Adenocarcinoma Cells. *Vet. Comp. Oncol.* **2019**, *17*, 174–183. [[CrossRef](#)]
31. Chambers, M.R.; Foote, J.B.; Bentley, R.T.; Botta, D.; Crossman, D.K.; Della Manna, D.L.; Estevez-Ordóñez, D.; Koehler, J.W.; Langford, C.P.; Miller, M.A.; et al. Evaluation of Immunologic Parameters in Canine Glioma Patients Treated with an Oncolytic Herpes Virus. *J. Transl. Genet. Genomics* **2021**, *5*, 423–442. [[CrossRef](#)]
32. Santos, M.R.; Xavier, P.L.P.; Pires, P.R.L.; Rochetti, A.L.; Rosim, D.F.; Scagion, G.P.; de Campos Zuccari, D.A.P.; Munir, M.; Ferreira, H.L.; Fukumasu, H. Oncolytic Effect of Newcastle Disease Virus Is Attributed to Interferon Regulation in Canine Mammary Cancer Cell Lines. *Vet. Comp. Oncol.* **2021**, *19*, 593–601. [[CrossRef](#)]
33. Igase, M.; Shousu, K.; Fujiki, N.; Sakurai, M.; Bonkobara, M.; Hwang, C.C.; Coffey, M.; Noguchi, S.; Nemoto, Y.; Mizuno, T. Anti-Tumour Activity of Oncolytic Reovirus against Canine Histiocytic Sarcoma Cells. *Vet. Comp. Oncol.* **2019**, *17*, 184–193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Béguin, J.; Foloppe, J.; Maurey, C.; Laloy, E.; Hortelano, J.; Nourtier, V.; Pichon, C.; Cochin, S.; Cordier, P.; Huet, H.; et al. Preclinical Evaluation of the Oncolytic Vaccinia Virus TG6002 by Translational Research on Canine Breast Cancer. *Mol. Ther.-Oncolytics* **2020**, *19*, 57–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Petrov, I.; Gentshev, I.; Vyalkova, A.; Elashry, M.I.; Klymiuk, M.C.; Arnhold, S.; Szalay, A.A. Canine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells (CAdMSCs) as a “Trojan Horse” in Vaccinia Virus Mediated Oncolytic Therapy against Canine Soft Tissue Sarcomas. *Viruses* **2020**, *12*, 750. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Cheng, P.H.; Wechman, S.L.; McMasters, K.M.; Zhou, H.S. Oncolytic Replication of E1b-Deleted Adenoviruses. *Viruses* **2015**, *7*, 5767–5779. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Fukuhara, H.; Ino, Y.; Todo, T. Oncolytic Virus Therapy: A New Era of Cancer Treatment at Dawn. *Cancer Sci.* **2016**, *107*, 1373–1379. [[CrossRef](#)]
38. Laborda, E.; Puig-Saus, C.; Rodríguez-García, A.; Moreno, R.; Cascalló, M.; Pastor, J.; Alemany, R. A PRb-Responsive, RGD-Modified, and Hyaluronidase-Armed Canine Oncolytic Adenovirus for Application in Veterinary Oncology. *Mol. Ther.* **2014**, *22*, 986–998. [[CrossRef](#)]
39. Minev, B.R.; Lander, E.; Feller, J.F.; Berman, M.; Greenwood, B.M.; Minev, I.; Santidrian, A.F.; Nguyen, D.; Draganov, D.; Killinc, M.O.; et al. First-in-Human Study of TK-Positive Oncolytic Vaccinia Virus Delivered by Adipose Stromal Vascular Fraction Cells. *J. Transl. Med.* **2019**, *17*, 1–15. [[CrossRef](#)]
40. Hamada, M.; Yura, Y. Efficient Delivery and Replication of Oncolytic Virus for Successful Treatment of Head and Neck Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7073. [[CrossRef](#)]
41. Cervera-Carrascon, V.; Quixabeira, D.C.A.; Havunen, R.; Santos, J.M.; Kutvonen, E.; Clubb, J.H.A.; Siurala, M.; Heiniö, C.; Zafar, S.; Koivula, T.; et al. Comparison of Clinically Relevant Oncolytic Virus Platforms for Enhancing T Cell Therapy of Solid Tumors. *Mol. Ther.-Oncolytics* **2020**, *17*, 47–60. [[CrossRef](#)]
42. Nguyen, S.M.; Thamm, D.H.; Vail, D.M.; London, C.A. Response Evaluation Criteria for Solid Tumours in Dogs (v1.0): A Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG) Consensus Document. *Vet. Comp. Oncol.* **2015**, *13*, 176–183. [[CrossRef](#)]
43. Yazbek, K.V.B.; Fantoni, D.T. Validity of a Health-Related Quality-of-Life Scale for Dogs with Signs of Pain Secondary to Cancer. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2005**, *226*, 1354–1358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Schneider, C.A.; Rasband, W.S.; Eliceiri, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 671–675. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Mantwill, K.; Klein, F.G.; Wang, D.; Hindupur, S.V.; Ehrenfeld, M.; Holm, P.S.; Nawroth, R. Concepts in Oncolytic Adenovirus Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 10522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Worgall, S.; Wolff, G.; Falck-Pedersen, E.; Crystal, R.G. Innate Immune Mechanisms Dominate Elimination of Adenoviral Vectors Following in Vivo Administration. *Hum. Gene Ther.* **1997**, *8*, 37–44. [[CrossRef](#)]
47. Zhou, J.; He, Z.; Ma, S.; Liu, R. AST/ALT Ratio as a Significant Predictor of the Incidence Risk of Prostate Cancer. *Cancer Med.* **2020**, *9*, 5672–5677. [[CrossRef](#)]
48. Zhang, L.X.; Lv, Y.; Xu, A.M.; Wang, H.Z. The Prognostic Significance of Serum Gamma-Glutamyltransferase Levels and AST/ALT in Primary Hepatic Carcinoma. *BMC Cancer* **2019**, *19*, 841. [[CrossRef](#)]
49. Steffl, J.L.; Bennett, W.; Olyaei, A.J. The Old and New Methods of Assessing Kidney Function. *J. Clin. Pharmacol.* **2012**, *52*, 63S–71S. [[CrossRef](#)]

50. Saleh, R.; Elkord, E. Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy: Role of Tumor-Mediated Immunosuppression. *Semin. Cancer Biol.* **2020**, *65*, 13–27. [[CrossRef](#)]
51. Rogers, K.S.; Helman, R.G.; Walker, M.A. Squamous Cell Carcinoma of the Canine Nasal Planum: Eight Cases (1988-1994). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **1995**, *31*, 373–378. [[CrossRef](#)]
52. Polton, G.; Finotello, R.; Sabbatini, S.; Rossi, F.; Laganga, P.; Vasconi, M.E.; Barbanera, A.; Stiborova, K.; Rohrer Bley, C.; Marconato, L. Survival Analysis of Dogs with Advanced Primary Lung Carcinoma Treated by Metronomic Cyclophosphamide, Piroxicam and Thalidomide. *Vet. Comp. Oncol.* **2018**, *16*, 399–408. [[CrossRef](#)]
53. Wylleman, B.; Brancato, L.; Gorbashieva, I.; Van Zwol, E.; Mori Da Cunha, M.G.M.C.; Benoit, J.; Tierny, D.; Vueghs, P.; Van Den Bossche, J.; Rudenko, O.; et al. Tolerability of Long-Term Temperature Controlled Whole-Body Thermal Treatment in Advanced Cancer-Bearing Dogs. *Int. J. Hyperth.* **2021**, *39*, 48–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Moreno, R.; Fajardo, C.A.; Farrera-Sal, M.; Perise-Barríos, A.J.; Morales-Molina, A.; Al-Zaher, A.A.; García-Castro, J.; Alemany, R. Enhanced Antitumor Efficacy of Oncolytic Adenovirus-Loaded Menstrual Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells in Combination with Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Mol. Cancer Ther.* **2019**, *18*, 127–138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Frelaut, M.; du Rusquec, P.; de Moura, A.; Le Tourneau, C.; Borcoman, E. Pseudoprogression and Hyperprogression as New Forms of Response to Immunotherapy. *BioDrugs* **2020**, *34*, 463–476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Boutilier, A.J.; ElSawa, S.F. Macrophage Polarization States in the Tumor Microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6995. [[CrossRef](#)]
57. Krane, G.A.; O’Dea, C.A.; Malarkey, D.E.; Miller, A.D.; Miller, C.R.; Tokarz, D.A.; Jensen, H.L.; Janardhan, K.S.; Shockley, K.R.; Flagler, N.; et al. Immunohistochemical Evaluation of Immune Cell Infiltration in Canine Gliomas. *Vet. Pathol.* **2021**, *58*, 952–963. [[CrossRef](#)]