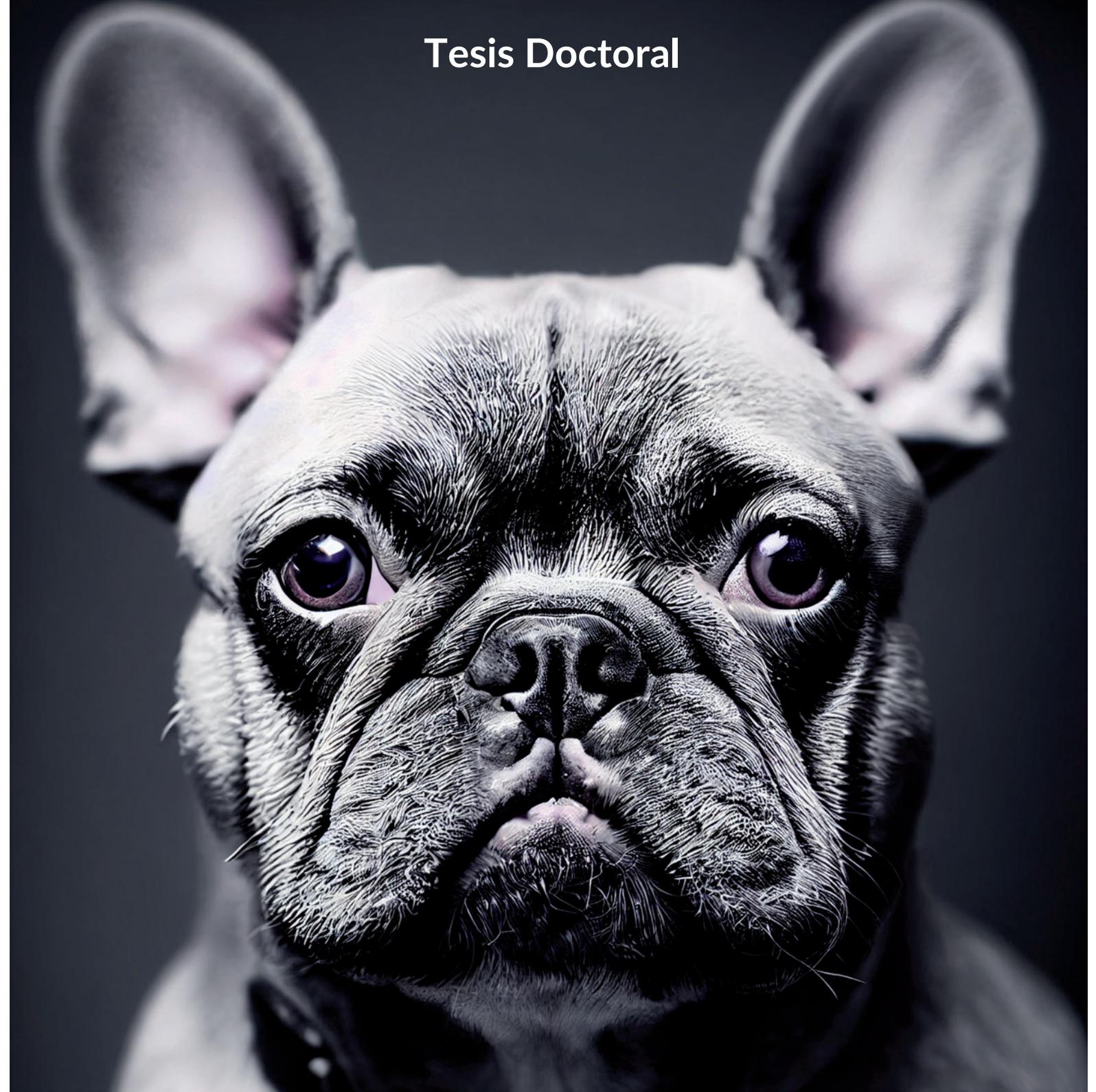


Tesis Doctoral



For IN VITRO determination of antibodies to:  
POSITIVE REFERENCE  
PARVOVIRUS  
LOT: 200113

Biog

**EFICACIA Y SEGURIDAD DE LA VIROINMUNOTERAPIA  
SISTÉMICA CELULAR PARA EL TRATAMIENTO DE  
GLIOMAS ROSTROTENTORIALES DE ALTO GRADO EN  
PERROS**

*Isidro Mateo*



UNIVERSIDAD ALFONSO X EL SABIO  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE DOCTORADO

BIOLOGÍA REGENERATIVA Y NUEVAS TERAPIAS

TESIS DOCTORAL

**Eficacia y seguridad de la viroinmunoterapia  
sistémica celular para el tratamiento de gliomas  
rostromentoriales de alto grado en perros**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

Isidro Mateo Pampliega

Director: Javier García Castro

Tutor: Fernando Vázquez Fernández

Madrid, 2024



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, 25 de Febrero de 2024

El Director, **Dr. Javier García Castro**, de la tesis doctoral titulada « **Eficacia y seguridad de la viroinmunoterapia sistémica celular para el tratamiento de gliomas rostrotentoriales de alto grado en perros** » del doctorando **D. Isidro Mateo Pampliega** declara que dicho trabajo es apto para la defensa ante el Tribunal que valorará la obtención del título de Doctor.

Fdo. El Director de la Tesis Doctoral  
Javier García Castro

---

## Agradecimientos

Después de casi veinte años dedicado en exclusiva a la neurología veterinaria realizando una labor eminentemente clínica y académica en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad Alfonso X el Sabio, pensé que me resultaría fácil escribir esta tesis doctoral que trata sobre el tratamiento de los gliomas de alto grado en perros. Este es un tema que me interesa particularmente ya que atiendo de manera rutinaria a estos pacientes. No obstante, me equivocaba. Una tesis doctoral como la que presento requiere la integración de multitud de disciplinas sobre las que poco o nada tenía conocimiento y la colaboración de muchos profesionales en el manejo de los pacientes, las muestras laboratoriales, los estudios histopatológicos, el análisis de datos estadísticos, los estudios genéticos, etc... Sirva esta página para darles a todos ellos mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar a mi director de tesis, Javier García Castro, cerebro de este estudio, capaz de unir dos mundos aparentemente tan distanciados como son la clínica y el laboratorio. La paciencia que ha tenido, a pesar de mis eternas demoras en la redacción de esta tesis, es algo ciertamente notable. Agradezco profundamente su confianza, rapidez en las revisiones y particularmente, el haberme permitido conocer cómo el trabajo experimental es aplicable a la clínica diaria. En el conocimiento de este trabajo experimental y en la motivación para el desarrollo de nuevos proyectos relacionados con el tratamiento de los gliomas caninos también ha influido de manera particularmente relevante Ana Judith Perisé Ba-

rrios. A ella le doy las gracias por dejarme entrar en el laboratorio y por llenarme la cabeza con las nuevas posibilidades de tratamiento de nuestros pacientes. Es admirable la pasión con la que Javier y Judith se dedican a su trabajo y ayudan al desarrollo de la ciencia española.

No puedo menos que agradecer también la perseverancia y apoyo incondicional de mi tutor Fernando Vázquez Fernández quien, cuando ya daba por perdida la posibilidad de terminar la tesis, hizo que siguiese adelante. Las facilidades que ha proporcionado, su trato cercano y su ayuda han sido imprescindibles para el desarrollo de este proyecto.

Si Javier ha sido el cerebro de este trabajo, el corazón lo ha sido Ana Cloquell, que hizo su residencia para el Colegio Europeo de Neurología Veterinaria en el HCV – UAX durante los años en los que se trataron a los pacientes con cCelyvir. Ella se encargó de organizar el trabajo hospitalario, revisión de los pacientes tratados y el registro y ordenación de los datos clínicos. Además, acompañó de la mejor manera posible a los propietarios de los perros tratados. Su amor por la veterinaria, la neurología y particularmente por los perros es algo que yo, y seguro que todos los pacientes que pasan por sus manos, agradecen sinceramente.

Esta gratitud la hago extensiva a los veterinarios y auxiliares del HCV-UAX y del hospital veterinario VETSIA que ayudaron en el manejo y realización de las pruebas diagnósticas en los pacientes.

---

Mi desarrollo profesional no podría haber sido el que es sin la referencia de muchas otras personas a las que he querido imitar por su forma de entender la veterinaria, su pasión por la profesión y su calidad humana. En particular agradezco a Andrés Sánchez Carmona, Jose Luis Puchol y Guillermo Perna Monroy el haberme guiado en mi camino como veterinario.

Probablemente no me dedicaría a la neurología veterinaria si Valentina Lorenzo no me hubiese aceptado como residente. A ella la doy las gracias por lo mucho que aprendí en el Hospital Vete-

rinario Sierra de Madrid, lugar donde conocí a Alberto Muñoz, médico neurorradiólogo que, además de aportarme un conocimiento que aplico diariamente, me ha apoyado en todos los proyectos que he emprendido.

Y finalmente querría dar un reconocimiento a todos aquellos que me han servido de guía en la vertiente más académica de la veterinaria, en particular a Joaquín Camón Urgel, que fue catedrático de anatomía y gracias al cual siento una extraña devoción por las malformaciones congénitas y al que echo de menos desde hace muchos años.

# Índice

<b>RESUMEN</b>	<b>8</b>	<b>OBJETIVOS DEL ESTUDIO</b>	<b>23</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>9</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>24</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>10</b>	Pacientes caninos	24
<b>ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS</b>	<b>12</b>	<i>Criterios para la selección de los casos</i>	24
Índice de figuras	12	<i>Criterios de exclusión</i>	25
Índice de tablas	12	Recogida de datos	25
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>13</b>	Preparación del tratamiento (Celyvir canino o cCelyvir)	26
Situación actual	13	Protocolo terapéutico con cCelyvir	27
A hombros de gigantes: el desarrollo de los virus oncolíticos	14	Análisis hematológicos	28
Mejora de los CRAds	16	Seguimiento clínico	28
Aplicación de los CRAds en el tratamiento de gliomas	17	Evaluación radiológica de las lesiones	29
Uso de células mesenquimales para la vehiculización de virus oncolíticos	17	Estudios histopatológicos	30
CRAds vehiculizados con CMMs para el tratamiento de gliomas	20	Estudios inmunohistoquímicos	31
Aplicación de los CRAds en el tratamiento de neoplasias caninas	21	Análisis de citoquinas	32
Animales domésticos como modelos experimentales	21	Determinación de anticuerpos anti-adenovirus	33
		Cuantificación por qPCR de genomas adenovirales	33
		Análisis por citometría de flujo de poblaciones leucocitarias	34
		Análisis de infiltrado inmune intratumoral por CIBERSORT	34
		Análisis estadístico	35

<b>RESULTADOS</b>	<b>36</b>	<b>Justificaciones para la limitada eficacia de cCelyvir</b>	<b>59</b>
Pacientes incluidos y estado clínico	36	<i>Retraso o llegada inadecuada de cCelyvir al SNC por secuestro de las CMMs en los pulmones y otros órganos</i>	59
Seguridad y toxicidad del tratamiento con cCelyvir	36	<i>Las CMMs podrían no tener la capacidad de anidamiento en gliomas caninos</i>	60
Hallazgos radiológicos	40	<i>Impermeabilidad de la BHE para las CMMs</i>	61
Respuesta clínica	41	<i>ICOCAV-17 podría no ser efectivo en tumores gliales caninos de alto grado</i>	61
Detección del virus oncolítico e inmunidad antiviral	43	<i>Las características específicas del sistema inmunitario del SNC y la inconsistencia de la reacción inmunitaria provocada por el ICOCAV-17</i>	62
Respuesta inmunitaria en sangre periférica	43	<b>Nuevas líneas de investigación</b>	<b>62</b>
Infiltrado tumoral por sistema inmunitario	44	<i>Combinación de tratamientos experimentales con terapias clásicas.</i>	62
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>53</b>	<i>Administración del virus oncolítico mediante inyección intratumoral</i>	63
Reseña y semiología clínica de los pacientes	53	<i>Modificación del virus oncolítico para mejorar su efecto citolítico / reducir su potencial efecto osteoclástico</i>	63
Seguridad del tratamiento con cCelyvir	53	<i>Potenciación de la respuesta inmunitaria frente a las células tumorales.</i>	63
<i>Efectos sistémicos</i>	53	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>65</b>
<i>Resorción ósea del calvario</i>	54	<b>ANEXO</b>	<b>73</b>
<b>Efectos del tratamiento con cCelyvir</b>	<b>55</b>		
<i>Sobre el sistema inmunitario y la respuesta inflamatoria sistémica</i>	55		
<i>Sobre la población inmunitaria intratumoral</i>	56		
<b>Eficacia clínica del cCelyvir</b>	<b>57</b>		

# Resumen

## Introducción

Los virus oncolíticos tienen un interés creciente tanto en oncología humana como veterinaria debido a su utilidad en el tratamiento de tumores inoperables o diseminados como los gliomas de alto grado. Los perros tienen gliomas malignos con una gran similitud biológica, genética, fenotípica, inmunológica y clínica con los gliomas presentes en humanos. Estas características apoyan un enfoque comparativo que permite la utilización de pacientes oncolíticos caninos como modelos aplicables a la clínica humana. La administración de virus oncolíticos por vía sistémica en la práctica clínica supone un reto dadas las limitaciones para alcanzar y atacar efectivamente los tumores y metástasis debido a la activación del sistema inmunitario del paciente. La vehiculización de estos virus oncolíticos por células madre mesenquimales podría evitar la respuesta inmunitaria frente a los virus y además mejorar su diseminación en el tumor debido a su capacidad de anidamiento. Este tratamiento denominado Celyvir ha demostrado su eficacia en el tratamiento de humanos y perros con tumores sólidos extracraneales.

## Objetivos

Evaluar la seguridad y eficacia de cCelyvir (células madre mesenquimales caninas infectadas con el adenovirus oncolítico canino ICOCAV-17) administrado por vía sistémica (intravenosa) en perros con gliomas de alto grado. Cuantificar los cambios en las poblaciones inmunes y respuesta inmune humoral antiviral en sangre periférica derivados del tratamiento. Caracterizar las poblaciones inmunes infiltradas en los tumores de perros tratados, así como la presencia de virus en el tumor.

## Material y métodos

Diez perros con gliomas rostrorotenciales de alto grado a los que se les sometió a viroterapia celular con cCelyvir mediante infusión sistémica semanal durante 8 semanas. La eficacia se determinó de acuerdo a la evaluación de la respuesta en neurooncología veterinaria considerando su estado

clínico y las mediciones de la lesión obtenidas mediante RM. Se evaluaron la historia médica, el estado físico y neurológico y el estatus vacunal antes y durante el seguimiento. La seguridad se evaluó mediante examen físico y los cambios en los parámetros hematológicos y bioquímicos en sangre. La población inmune se evaluó mediante citometría de flujo en sangre y por la expresión génica y la inmunohistoquímica en el microambiente tumoral.

## Resultados

El tratamiento fue bien tolerado y no se encontraron efectos adversos graves. Dos perros tuvieron respuesta parcial (76% y 86% en la reducción del volumen tumoral) mientras que tres manifestaron una enfermedad estable en la RM de revisión. El ICOCAV-17 se detectó en la sangre de los nueve perros en los que se midió y se encontró una relación entre las partículas de ICOCAV-17 y los anticuerpos frente a adenovirus canino. Se demostró la existencia de ICOCAV-17 en 3 tumores tras la necropsia. Los perros con enfermedad estable y respuesta parcial tendieron a tener una infiltración menor de células B de memoria y un incremento en las líneas celulares monocito / macrófago. Se observó un ligero incremento en los tiempos de supervivencia media en comparación con otras modalidades terapéuticas descritas en la literatura veterinaria como el tratamiento paliativo o la cirugía.

## Conclusiones

El tratamiento con cCelyvir es seguro y tiene una eficacia limitada en gliomas rostrorotenciales caninos de alto grado. El ligero incremento en el tiempo de supervivencia media y la ausencia de efectos adversos reseñables hace del cCelyvir un candidato para el tratamiento combinado con otras modalidades terapéuticas. Los datos descritos, utilizando al perro como un modelo preclínico, podrían ser de utilidad en el desarrollo de nuevos ensayos terapéuticos en medicina humana mejorando sus expectativas de éxito.

---

## Summary

### Introduction

Oncolytic viruses constitute a growing field of interest, both in human and veterinary oncology, given that they are particularly helpful for treating non-surgical tumors and disseminated cancer, such as high-grade gliomas. Companion dogs present malignant gliomas with biological, genetic, phenotypic, immunological, and clinical similarities to human gliomas. These features favor comparative approaches, leading to the treatment of canine oncological patients to achieve translational applications to the human clinic. The systemic administration of oncolytic viruses presents a challenge due to their limitations in effectively targeting tumors and metastases due to the activation of the patient's immune cellular. The use of mesenchymal stem cells as cellular carriers for oncolytic viruses could avoid the systemic immunity against the viruses and even further to improve its spread in the tumor due to their tumor-homing capacity. This treatment named Celyvir has been effective in humans and dogs with extracranial solid tumors.

### Objective

To evaluate the safety and efficacy of cCelyvir (canine mesenchymal stem cells infected with the canine oncolytic adenovirus ICOCAV-17) systemically (intravenously) administered in dogs with high-grade gliomas. To quantify changes in the immune population and antiviral humoral immune response in peripheral blood associated with treatment. Characterization of tumor immune population infiltration in treated dogs as well as the presence of virus in the tumor.

### Material and methods

Ten dogs with high-grade rostromentorial gliomas underwent weekly systemic endovenous cellular virotherapy with cCelyvir for 8 weeks. Efficacy was determined according to the Response Assessment in Veterinary Neuro-Oncology criteria considering clinical status and MRI measure-

ments. Medical history, physical and neurological examinations, and vaccination status were evaluated prior to and during follow-up. Safety was evaluated by physical examinations and hematological and biochemical changes in peripheral blood. Immune populations were analyzed by flow cytometry in peripheral blood and by gene expression and immunohistochemistry in the tumor microenvironment.

### Results

The treatment was well tolerated and major adverse effects were not observed. Two dogs had partial responses (76% and 86% reduction in tumor size), and 3/7 showed stable disease. ICOCAV-17 was detected in peripheral blood in all of the dogs in which it was measured (9), and a correlation between the ICOCAV-17 particles and anti-canine adenovirus (CAV) antibodies was observed. ICOCAV-17 was detected in 3 tumor tissues after necropsies. Regarding tumor-infiltrating lymphocytes, the dogs with disease stabilization and partial response tended to have reduced memory B-cell infiltration and increased monocyte/macrophage lineage cells. A slight increase in median survival time was observed compared to other therapeutic modalities (palliative or surgery) described in the veterinary literature.

### Conclusions

These findings indicate that dCelyvir is safe and presents limited efficacy in canine rostromentorial high-grade gliomas. The mild increased median survival time compared with previous reports describing the prognosis of palliative treatment or surgery makes cCelyvir a candidate for combination therapy with surgery or different administration routes. The reported data using dogs as a preclinical model could serve as a transition in the therapeutic development of human medicine and can potentially improve the success of subsequent clinical trials.

---

## Abreviaturas

**Ad5:** Adenovirus serotipo 5.

**ALP:** Fosfatasa alcalina.

**ALT:** Alanina aminotransferasa.

**AST:** Aspartato aminotransferasa.

**BHE:** Barrera hematoencefálica.

**CAR:** *Coxsackie-adenovirus receptor*.

**CAV-2:** *Canine Adenovirus type II*. Adenovirus canino serotipo II.

**CD:** Células dendríticas.

**CMMs:** Células madre mesenquimales.

**CRAds:** *Conditionally replicating adenoviruses*. Adenovirus replicativos condicionales.

**CXCL:** *Chemokine (C-X-C) ligand*. Ligando de quimiocina (C-X-C).

**DAMPs:** *Danger associated molecular patterns*. Patrones moleculares asociados a peligro.

**DMSO:** Dimetilsulfóxido.

**EE:** Enfermedad estable.

**EP:** Enfermedad progresiva.

**FBS:** *Fetal bovine serum*. Suero fetal bovino.

**FLAIR:** *Fluid attenuated inversion recovery*.

**GBM:** Glioblastoma multiforme.

**Gd:** Gadolinio.

**GFAP:** *Glial fibrillary acidic protein*. Proteína ácida fibrilar glial.

**GM-CSF:** *Granulocyte-macrophage colony-stimulation factor*. Factor estimulante de colonias granulocitos y macrófagos.

**HBSS:** *Hanks balanced salt solution*. Solución salina balanceada de Hanks.

**Htc:** Hematocrito.

**HCV-UAX:** Hospital Clínico Veterinario - Universidad Alfonso X el Sabio.

**HVS:** Herpes virus simplex.

**IDH:** Isocitrato deshidrogenasa.

**IFN:** Interferón.

**IL:** Interleucinas.w

**LCR:** Líquido cefalorraquídeo.

**MAT:** Macrófago asociado al tumor.

**MGMT:** Metilguanina-ADN metil transferasa.

**MHC:** *Major histocompatibility complex*. Complejo mayor de histocompatibilidad.

**NK:** *Natural killers*.

**NDV:** *Newcastle Disease Virus*. Virus de la enfermedad de Newcastle.

**Olig2:** Factor de transcripción de oligodendrocito 2.

**PAMPs:** *Pathogen associated molecular patterns*. Patrones moleculares asociados a patógeno.

**PBS:** *Phosphate buffered saline*. Solución salina tampón fosfato.

**PSA:** *Prostate-specific antigen*. Antígeno específico prostático.

**qPCR:** *quantitative Polymerase Chain Reaction*. Reacción en cadena de la polimerasa.

**qPCR-RT:** *Real time quantitative Polymerase Chain Reaction*. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

**RAVNO:** *Response Assesment on Veterinary Neurooncology*. Evaluación de la respuesta en neurooncología veterinaria.

**Rb:** Retinoblastoma.

**RC:** Respuesta completa.

**RM:** Resonancia magnética.

**RP:** Respuesta parcial.

**SNC:** Sistema nervioso central.

**TAAs:** *Tumor Associated Antigens*. Antígenos asociados a tumor.

**TANs:** *Tumor associated neoantigens*. Neoantígenos asociados a tumor.

**TC:** Tomografía computarizada.

**TGF:** *Transformation growth factor*. Factor de crecimiento de transformación.

**TILs:** *Tumor-infiltrating lymphocytes*. Linfocitos infiltrantes del tumor.

**TMS:** Tiempo medio de supervivencia.

**UPMiC:** Unitat de patologia murina i comparada.

**VCOG – CTCAE:** *Veterinary cooperative oncology group for common terminology criteria of adverse events in dogs and cats*. Criterio común de terminología de efectos adversos en perros y gatos por el grupo cooperativo de oncología veterinaria

**VO:** Virus oncolítico.

# Índice de figuras y tablas

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Mecanismo de replicación selectiva de los adenovirus replicativos condicionales.	16
<b>Figura 2.</b> Modificaciones de la secuencia genética de CRAds caninos a partir de CAV-2.	18
<b>Figura 3.</b> Modificaciones de la secuencia genética de ICOCAV-17.	18
<b>Figura 4.</b> Actuación de las CMMs y su efecto en la viroterapia oncolítica.	19
<b>Figura 5.</b> Cronograma del tratamiento, toma de muestras y RM de pacientes tratados.	29
<b>Figura 6.</b> Caracterización de las lesiones evidenciadas mediante RM.	31
<b>Figura 7.</b> Peine del ELISA utilizado para la determinación de anticuerpos anti-CAV.	33
<b>Figura 8.</b> Representación gráfica de las razas de perros incluidos en el estudio.	36
<b>Figura 9.</b> Valores obtenidos en el hemograma.	38
<b>Figura 10.</b> Valores obtenidos en los principales parámetros de la bioquímica.	39
<b>Figura 11.</b> Valores de enzimas hepáticas.	40
<b>Figura 12.</b> Imágenes que demuestran la resorción ósea encontrada en tres perros.	42
<b>Figura 13.</b> Seguimiento radiológico y evaluación anatomopatológica de los perros con RM de revisión.	45
<b>Figura 14.</b> Variación del volumen tumoral en el estudio de RM de revisión y estadio RAVNO.	46
<b>Figura 15.</b> Diagrama de barras de los tiempos de supervivencia.	46
<b>Figura 16.</b> Curva de Kaplan-Meier de tiempos de supervivencia.	47
<b>Figura 17.</b> Correlación entre diferentes variables radiológicas y dosis de cCelyvir y el tiempo de supervivencia.	47

<b>Figura 18.</b> Virus oncolíticos y respuesta de anticuerpos.	48
---	----

<b>Figura 19.</b> Detección de ICOCAV-17 en gliomas de pacientes de perros 6 y 10.	48
--	----

<b>Figura 20.</b> Citoquinas en sangre periférica.	49
--	----

<b>Figura 21.</b> Patrones histopatológicos de los gliomas de los perros tratados.	50
--	----

<b>Figura 22.</b> Estudio inmunohistoquímico frente a población inmune en gliomas.	51
--	----

<b>Figura 23.</b> Caracterización del microambiente inmune intratumoral tras el tratamiento con cCelyvir.	52
---	----

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Estudios inmunohistoquímicos.	32
---	----

<b>Tabla 2.</b> Anticuerpos utilizados en la citometría de flujo.	35
---	----

<b>Tabla 3.</b> Hallazgos clínicos de los perros incluidos en el estudio.	37
---	----

<b>Tabla 4.</b> Resumen de las características radiológicas principales de las lesiones.	41
--	----

<b>Tabla 5.</b> Tiempos de supervivencia.	43
---	----

<b>Tabla 6.</b> Hallazgos inmunohistopatológicos de perros tratados con cCelyvir.	51
---	----

# Introducción

## Situación actual

Los tumores cerebrales son el octavo tipo de tumor más frecuente en personas mayores de 40 años<sup>1</sup>. Existen multitud de tipos neoplasias que pueden afectar al cerebro, ya sean tumores primarios como los derivados de las células de la glía (oligodendrogliomas o astrocitomas), de las meninges (meningiomas) o de otras estructuras intracraneales como los tumores asociados a los nervios craneales (p.ej. schwannoma), hipófisis (p.ej. macroadenoma hipofisario), tumores neuroectodérmicos, etc. Los tumores secundarios son aquellos que se originan en puntos distantes y que metastatizan al cerebro<sup>2</sup>. De todos ellos, los gliomas malignos o de alto grado suponen la mayoría, con una incidencia anual de entre 3 – 4 casos por cada 100.000 habitantes y una supervivencia media a los 5 años de únicamente un 6.8%<sup>1</sup>.

Por este motivo el tratamiento de los gliomas de alto grado supone un gran desafío en medicina humana y ha condicionado una intensa investigación durante los últimos treinta años, habiéndose propuesto numerosas mejoras en las técnicas quirúrgicas, de radioterapia y quimioterapia<sup>3</sup>, siendo el tipo de tumor que más financiación ha recibido durante este tiempo para su estudio<sup>4,5</sup>. Sin embargo, el tiempo de supervivencia medio de los pacientes con glioblastoma multiforme (GBM), la forma más frecuente y agresiva de los gliomas, es de 14.6 meses cuando se combina una resección quirúrgica amplia, radioterapia y tratamiento coadyuvante con temozolamida<sup>6</sup>. Esta falta de efectividad de las modalidades terapéuticas tradicionales se debe a su alta agresividad con rápido crecimiento y capacidad para invadir e infiltrar el parénquima, muchas veces regiones críticas y/o inaccesibles, su heterogeneidad molecular, la incapacidad para conseguir altas concentraciones de quimioterápicos en el tejido debido a la barrera hematoencefálica (BHE), la resistencia de células madre tumorales capaces de regenerarse tras los tratamientos antitumorales y a su capacidad para escapar del sistema inmunitario<sup>7,8</sup>.

Para tratar de sobreponerse a estas dificultades se están desarrollando nuevas líneas de investigación como la inmunoterapia y la terapia génica<sup>9</sup>. La inmunoterapia se define como *activa* si produce una activación del sistema inmunitario, estimulándolo para elaborar una población celular o humoral dirigida contra los antígenos tumorales o ser *pasiva* si consiste en la transferencia directa de anticuerpos o células generadas *in vitro* frente al tumor<sup>10</sup>.

Por otro lado, la terapia génica consiste en la introducción de un material genético en una célula con el propósito de que, ya sea por sí mismo, o por expresión de sus transgenes, de lugar a la mejora de un proceso patológico. Este material genético puede ser administrado de manera directa (denominado ADN o ARN desnudo) o vehiculado por vectores no virales como liposomas, micelas, conjugados moleculares o bacterias<sup>11</sup>. También pueden utilizarse virus como vectores del material genético (uno o algunos pocos genes) en células tumorales. Estos vectores deben tener la capacidad de infectar eficientemente a las células tumorales y ejercer su efecto terapéutico mediante la expresión de genes citotóxicos<sup>12,13</sup>. Los virus también pueden tener una acción lítica directa sobre la célula tumoral, siendo entonces denominados virus oncolíticos. Esta lisis de las células tumorales producirá una activación del sistema inmune que ayuda a mejorar el efecto antitumoral del tratamiento, motivo por el cual al tratamiento con virus oncolíticos se le denomina habitualmente viroinmunoterapia<sup>14</sup>. Su utilización para el tratamiento de los gliomas malignos está en pleno desarrollo en medicina humana, con multitud de ensayos clínicos en curso<sup>15-17</sup> y, en menor medida en perros<sup>18,19</sup>.

Los virus oncolíticos tienen un mecanismo de acción multimodal con efectos tóxicos sobre las células tumorales, tanto directo como indirecto, provocando la lisis celular, potenciando la eficacia del sistema inmunitario y de otros agentes terapéuticos frente a las células tumorales y la destrucción del aporte vascular al lecho tumo-

ral<sup>14</sup>. Inducen la producción de citoquinas pro-inflamatorias, desencadenan la expresión de neoantígenos tumorales y moléculas MHC clase I y PD-L1 por parte de las células neoplásicas lo que amplifica la respuesta inmune local y favorece la llegada de células inmunes al tumor<sup>14</sup>. El sistema inmunitario del paciente juega un papel decisivo en la terapia frente al cáncer, ya que se conoce que uno de los factores predictivos más importantes para el éxito de la terapia con virus oncolíticos es la preexistencia de linfocitos infiltrantes del tumor (*tumor-infiltrating lymphocytes*, TILs) así como una alta expresión de dianas inmunomoduladoras por parte del tumor antes de la inoculación. En este contexto la terapia con virus oncolíticos se puede beneficiar de la utilización de otros agentes inmunomoduladores, ya sea aumentando la eficacia de los virus o superando los mecanismos de resistencia tumoral<sup>20</sup>. Una adecuada respuesta inmunitaria frente al tumor mejora el éxito de multitud de tratamientos antitumorales, incluyendo el de los virus oncolíticos, y es por ello que en la actualidad el tratamiento con virus oncolíticos busca, por un lado, mejorar la actividad citolítica del propio virus, pero en segundo término y de manera no menos importante, la activación del sistema inmunitario del paciente para amplificar su efecto antitumoral, situación particularmente importante en el caso de los gliomas de alto grado, considerados tradicionalmente como tumores *fríos* (asociados a una muy limitada reacción del sistema inmunitario del paciente)<sup>21</sup>.

### A hombros de gigantes: el desarrollo de los virus oncolíticos

La utilización de virus para el tratamiento de tumores humanos se ha venido desarrollando durante los últimos 40 años, con una importante aceleración durante los últimos 20 años<sup>22</sup>. Desde el principio, el GBM, debido a la relativa ineficacia de los tratamientos convencionales como la quimioterapia, la radioterapia o la cirugía, ha sido un objetivo fundamental en el desarrollo de la viroterapia<sup>23</sup>. Aunque se han desarrollado más de 20 virus distintos con innumerables variaciones y mejoras que incluyen herpes virus simplex

(HVS), adenovirus, virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), reovirus, H1 parvovirus, virus del sarampión y el virus de la polio, todos ellos deben poseer unas características comunes para poder ser utilizados en el tratamiento del cáncer<sup>23</sup>.

- Gran selectividad para el desarrollo en células tumorales.
- Gran potencia citotóxica en células tumorales y ser relativamente inocuo en células normales.
- Posibilidad de administración sistémica en aquellos pacientes con tumores de difícil acceso o diseminados.
- Rápido ciclo replicativo que permita una diseminación viral rápida.
- Ser susceptible de ser modificado genéticamente y que sea estable una vez producido.
- Ser capaz de desencadenar una potente inmunidad antitumoral.
- Ausencia de preinmunidad de los pacientes. De otra manera el sistema inmunitario eliminaría el virus antes de la infección en las células tumorales.
- Disponibilidad de agentes antivirales para controlar la diseminación viral no deseada.
- Facilidad en su producción.

Los virus que mejor cumplen estas características son los HVS y los adenovirus siendo en ellos donde se ha centrado el cuerpo de las investigaciones en el tratamiento frente al GBM<sup>11</sup>. Los adenovirus son virus de entre 80 – 90nm de diámetro con una cápside icosaédrica conformada de hexones y pentonas. Desde cada pentona sale una fibra con una cabeza en su extremo que proporciona un anclaje a los receptores celulares<sup>24</sup>.

Una vez internalizados los adenovirus expresan los genes tempranos E1A, E1B, E2, E3 y E4 que modulan la expresión genética de la célula necesaria para la síntesis de proteínas virales y la replicación de su genoma viral<sup>25</sup>. Inicialmente se utilizaron adenovirus modificados para que fuesen incapaces de replicarse como vectores de

genes terapéuticos o vacunas tanto en medicina humana como en veterinaria<sup>25,26</sup>. La aplicación de estos vectores virales en el tratamiento de diversos tipos de cáncer se basa en la infección selectiva en células tumorales donde el adenovirus puede inducir la producción de genes supresores de tumores, como p53, o citoquinas que cambian el microambiente del tumor dando lugar al reclutamiento o activación de células inmunes<sup>25</sup>. Estos vectores virales deben de ser diferenciados de los virus oncolíticos propiamente dichos, en los que el efecto antitumoral principal se produce por la acción citolítica del virus tras su replicación intracelular aprovechando la maquinaria de la célula hospedadora y no por la expresión de sus transgenes. No obstante, las nuevas versiones de virus oncolíticos armados, además de la lisis celular también pueden secretar otros transgenes que potencian su acción antitumoral.

Modificaciones realizadas sobre el adenovirus serotipo 5 (Ad5) han permitido que se replique preferentemente sobre células tumorales induciendo la muerte de las mismas por lisis de la membrana celular tras su liberación, quedando las nuevas partículas víricas libres en el microambiente tumoral y siendo capaces de infectar nuevas células tumorales y, por tanto, de repetir el ciclo<sup>27</sup>. Aquellos adenovirus que son capaces de replicarse únicamente en células tumorales se denominan adenovirus replicativos condicionales (CRAds, del inglés *conditionally replicating adenoviruses*). Esta inocuidad de los adenovirus para las células sanas se ha conseguido de dos maneras. La primera es limitando la expresión del gen E1A (que codifica una proteína esencial para la replicación viral estimulando la entrada celular en la fase S) mediante la utilización de promotores tumorales específicos que reemplazan las secuencias virales endógenas para restringir la replicación del virus<sup>27</sup>. Un ejemplo es la introducción de un promotor dependiente del gen productor del antígeno específico prostático (PSA, del inglés *prostate-specific antigen*) en la secuencia del E1A, lo que hace que la replicación del virus sea mayor en tejidos en los que los niveles de PSA sean elevados<sup>28</sup>, esto es en cáncer de

próstata donde ya hay estudios clínicos que demuestran su utilidad en circunstancias clínicas específicas (pacientes con tumores refractarios o recurrentes sometidos a radioterapia)<sup>29</sup>.

La segunda manera utilizada para controlar la replicación selectiva de estos virus consiste en la eliminación de genes con funciones críticas necesarias para la replicación en células quiescentes (sanas) pero no en células en división (tumorales). Muchas de las proteínas reguladoras de la replicación celular que son inactivadas por productos de genes virales durante la replicación del adenovirus son también inactivadas durante la carcinogénesis. Por este motivo, los productos de genes virales necesarios para la inactivación de una proteína celular son innecesarios en células tumorales ya que se ha perdido la proteína objetivo o tiene una actividad alterada<sup>27</sup>. En este contexto se han producido dos tipos fundamentales de CRAds, aquellos con una modificación en el gen E1B que les hace incapaces de replicarse en células que expresan el gen p53 y los que tienen una pequeña delección en el gen E1A que restringe su interacción con la proteína del retinoblastoma (Rb). La proteína p53 es imprescindible en el control de la división y apoptosis celular en células normales y que el gen que la codifica está mutado en la mayor parte de los tumores<sup>30</sup>. La proteína del Rb es una proteína crítica para el funcionamiento del punto del control G1 de la división celular y también está mutada en la mayoría de los tumores<sup>31</sup>. La delección del gen E1A en adenovirus humanos consiste en la eliminación de 24 pares de bases de este gen, por lo que de manera genérica estos virus son denominados Ad5-Δ24<sup>32</sup>.

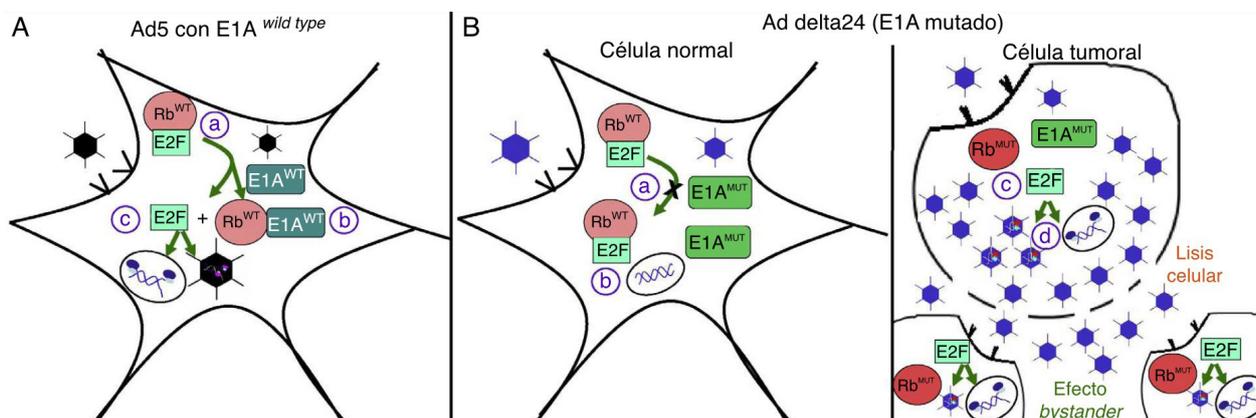
En células normales que no se encuentran en proliferación, la proteína del Rb forma un complejo con el factor de transcripción E2F, involucrado en el control del ciclo celular. Cuando un Ad5 salvaje infecta a una célula normal ésta sintetiza la proteína E1A que se une al retinoblastoma, desligándola del complejo Rb-E2F, haciendo que el factor de transcripción E2F quede libre y por tanto induciendo la replicación viral, lo que da lugar, en úl-

timo término, a la lisis celular por rotura de la membrana celular debido a la liberación de los virus. Este es el mecanismo citopatogénico de los virus en condiciones naturales. Esta misma situación se produce en una célula tumoral, pero con la salvedad de que la proteína E1A vírica no necesita unirse al complejo Rb-E2F ya que este complejo está alterado en la gran mayoría de los tumores y, en particular, en los gliomas<sup>32</sup>. La modificación genética del gen E1A viral hace que cuando el virus mutado infecta a células normales, el complejo E1A-Δ24 no se puede unir con la proteína del Rb y no se libera el factor de transcripción E2F por lo que no se desencadena el ciclo de replicación celular, con la consecuente incapacidad para la replicación viral en células sanas. Sin embargo, cuando el virus modificado afecta a una célula tumoral, la proteína E2F ya está desligada del complejo Rb-E2F, por lo que la replicación celular continúa de las células tumorales ayuda a la replicación del virus haciendo que la célula tumoral muera tras la liberación de nuevas partículas víricas mutadas<sup>13</sup> (Figura 1).

Yendo un poco más allá, se puede obtener un virus recombinante insertando el promotor del ciclo celular E2F como un promotor de regulador del gen E1A; esta modificación es la que dió lugar al desarrollo del CRAd denominado ICOVIR-5<sup>33</sup>. El ONYX-015 es el CRAd con inhibición de la función del p53 más utilizado<sup>34,35</sup>, mientras que el ICOVIR-5 y el DNX-2401 tienen la delección Δ24 en el gen E1A<sup>33,36,37</sup>.

### Mejora de los CRAds

Con el objetivo de optimizar los CRAds se ha potenciado su infectividad modificándolos para que desarrollen un mayor tropismo por las células tumorales. En condiciones naturales, los Ad5 infectan las células (tumorales y no tumorales) a través de receptores de membrana denominados CAR (del inglés *coxsackie-adenovirus receptor*). Sin embargo, se ha demostrado que las células tumorales expresan pocos receptores CAR, por lo que estos virus han sido modificados para que resulten infectivos en ausencia de receptores CAR. Esto se consiguió gracias a la adición de un motivo RGD-4C en el lazo H1 del extremo de la



**Figura 1.** Imagen obtenida de Moreno Ayala y Candolfi<sup>13</sup> que describe la terapia con CRAds. (A) En células normales que no se encuentran en proliferación, la proteína de retinoblastoma (Rb) forma un complejo con el factor de transcripción E2F que interviene en la replicación celular (a). Tras la infección el Adenovirus salvaje (wild type) sintetiza la proteína E1A, que se une a Rb, permitiendo la liberación de E2F del complejo (b). El E2F libre desencadena así la replicación viral (c) que da lugar a la lisis celular. (B) En Ad5-Δ24, la proteína E1A ha sido mutada (E1A mutado), de manera que no puede interactuar con la proteína Rb (a). De este modo, E2F no es liberado y no se estimula la replicación viral (b) y por tanto la célula no sufre daño alguno y el material genético del Ad5-Δ24 es eliminado. Sin embargo, en células tumorales, la proteína del Rb se encuentra mutada y disociada del factor de transcripción E2F (c), y por lo tanto, está libre para inducir la replicación viral tras la infección Ad5-Δ24 (d), lo que da lugar a la lisis celular. Durante este proceso, se liberan partículas de Ad5-Δ24 que infectan a células vecinas, dando lugar a un potente efecto bystander o prolongación de la infección.

fibra<sup>38,39</sup>. Este virus se ha denominado ICOVIR-5 y ha demostrado su eficacia en el tratamiento *in vivo* de gliomas en modelos murinos<sup>33</sup>.

A partir de este ICOVIR-5 se han desarrollado sucesivas mejoras en su construcción que permiten una mayor infectividad y especificidad para las células tumorales denominándose con números sucesivos. Por ejemplo, el ICOVIR-15 que, a partir del ICOVIR-5, incluye cuatro palíndromos E2F1 en lugar del promotor, dando lugar a una expresión mayor de E1A en las células tumorales<sup>40,41</sup>. Finalmente se ha desarrollado el ICOVIR-17 en el que, para mejorar su diseminación, se insertó una secuencia genética que le permitía expresar la enzima hialuronidasa, la cual disocia la matriz extracelular haciendo más efectiva su distribución a lo largo del tumor<sup>42</sup>. Estos CRAds humanos han servido de modelo para el desarrollo de sus homólogos derivados del adenovirus canino serotipo 2 (CAV-2), denominándose ICOCAV-15 e ICOCAV-17<sup>43</sup> (Figura 2).

### Aplicación de los CRAds en el tratamiento de gliomas

Cerca del 80% de los glioblastomas tienen aberraciones en las vías del retinoblastoma, lo que hace a los CRAds cuyo ciclo celular es dependiente de esta vía los más adecuados para el tratamiento de este tipo de tumores. El Ad5-Δ24 fue modificado para incorporar el tripéptido RGD (Arg-Gly-Asp) (denominándose DNX-2401), que reconoce integrinas presentes en gliomas y de esa manera se facilitaba la entrada del virus en las células tumorales<sup>44</sup>. Esta modificación del RGD también fue incluido en los adenovirus oncolíticos caninos (Figura 3). Los estudios con ICOVIR-5 demostraron una efectividad mayor en células tumorales y un menor porcentaje de células sanas infectadas<sup>32</sup>. En un modelo ortotópico murino de xenoinjertos de células tumorales U87 se demostró una supervivencia mayor que en animales no tratados y comparable a los tratados con DNX-2401<sup>33</sup>. Puesto que los gliomas expresan bajos niveles de los receptores primarios del Ad5 (CAR)<sup>45</sup>, se han desarrollado estrategias para mejorar la infectividad de los CRAds

hacia las células tumorales que consisten fundamentalmente en hacer que el extremo terminal de la fibra del virus exprese receptores de moléculas superficiales frecuentemente presentes en las células del glioma, por ejemplo las integrinas  $\alpha_v$  o los proteoglicanos heparan sulfato<sup>46</sup>.

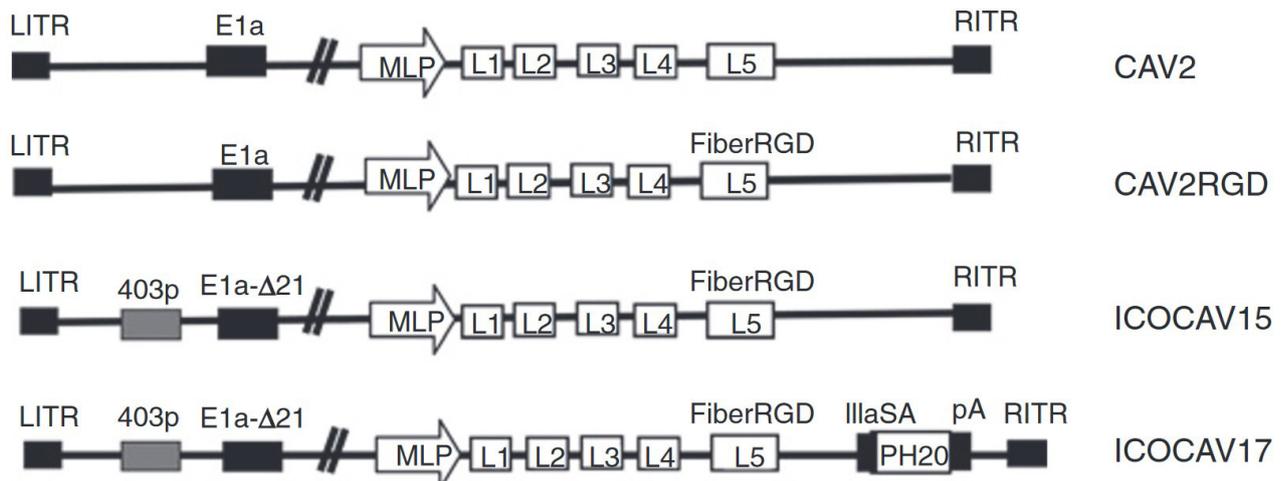
Otras estrategias para mejorar el efecto antineoplásico de los CRAds en pacientes con gliomas son<sup>46,47</sup>:

- Tratamiento previo mediante quimioterápicos como la temozolamida.
- Radioterapia.
- Expresión de moléculas pro-apoptóticas y/o genes suicidas.
- Mejora de la citotoxicidad mediante la manipulación genética.
- Mejora de la toxicidad del CRAd en presencia de hipoxia.
- Modulación de la respuesta inmunitaria.
- Mejora en el acceso de los virus hacia los tumores.
  - Inoculación directa.
  - Vehiculización del virus.

### Uso de células mesenquimales para la vehiculización de virus oncolíticos

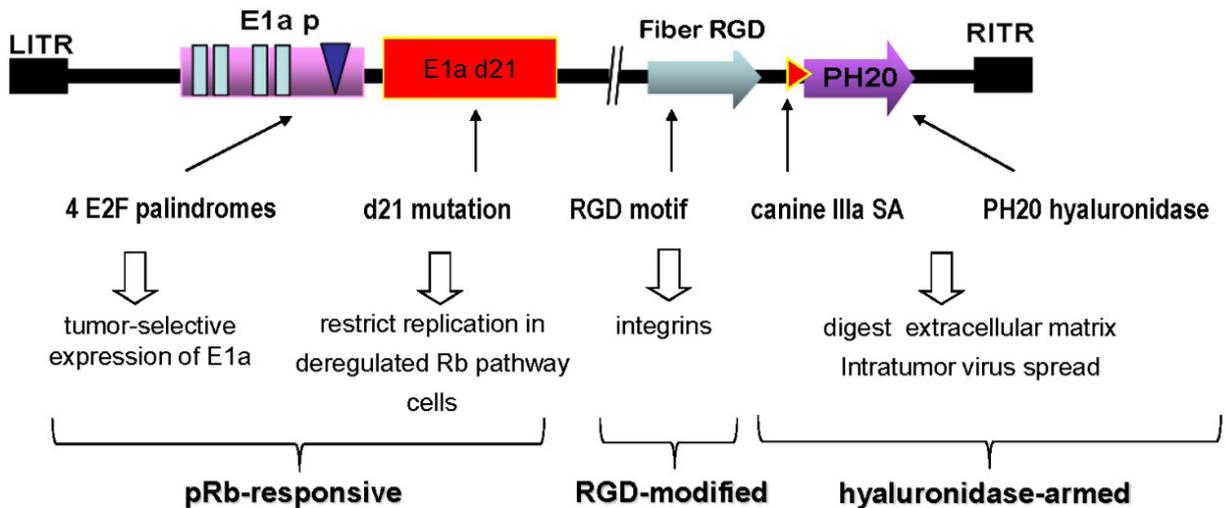
A pesar del éxito de los modelos preclínicos *in vitro* y en animales de laboratorio, se ha demostrado que en los pacientes existen múltiples barreras para la diseminación de los virus oncolíticos tras su inyección, ya sea sistémica o intratumoral y, por tanto, para la erradicación total del tumor<sup>48</sup>. Por ese motivo, se han desarrollado diversas modificaciones que permiten una mayor diseminación de los CRAds y su replicación en células tumorales<sup>22</sup> entre las que se encuentran la administración vehiculada a través de células<sup>49</sup>.

Uno de los requisitos fundamentales que deben cumplir las células como vehículos de agentes terapéuticos es su capacidad para dirigirse o anidar (del vocablo inglés *homing*) en los focos neoplásicos del hospedador. Esta



**Figura 2.** Esquema de las modificaciones de la secuencia genética de ICOCAV-15 e ICOCAV-17 frente a sus predecesores, el virus salvaje original (CAV-2) y su primera modificación (CAV-2RGD) que contiene un motivo RGD -4C en el lazo H1 del extremo de la fibra. En los CRAbs ICOCAV-15 e ICOCAV-17, basados en el CAV-2RGD, se han insertado cuatro palíndromo E2F1 en el lugar del promotor. Además se han eliminado 21 pares de bases en la región E1A (E1A- Δ21) está armado con el gen que codifica la hialuronidasa (PH20) bajo el homólogo de los adenovirus oncolíticos humanos Δ24. Finalmente, el ICOCAV-17 está armado con la hialuronidasa PH20 (PH20) bajo el control de la proteína canina IIIa del adaptador de ensamblaje (IIIaSA). Imagen tomada de Laborda y col.<sup>43</sup>.

### ICOCAV17 (105% CAV2)

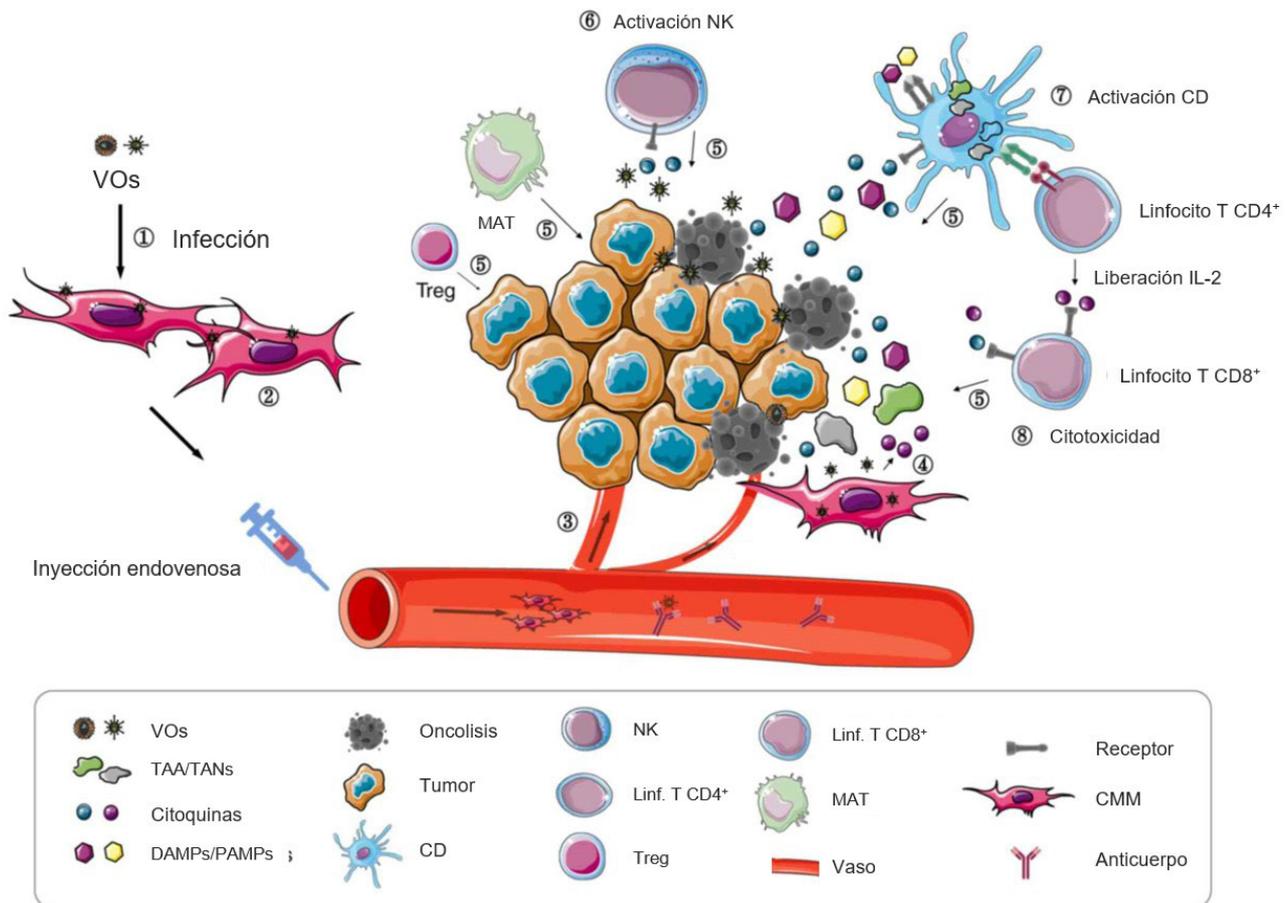


**Figura 3.** Esquema de las modificaciones de la secuencia genética de ICOCAV-17 y sus efectos funcionales.

propiedad de ciertas células es comparable a la que tienen los leucocitos para migrar y dirigirse a puntos de inflamación. Una de las células que cumple este criterio son las células madre / progenitoras mesenquimales (CMM)<sup>50,51</sup>. De hecho, se ha identificado que los pasos que siguen los leucocitos (anclado, rodeo, adhesión firme y diapédesis) ocurren igualmente tras la infusión endovenosa de

CMM, aunque se desconocen los mediadores específicos implicados en su extravasación hacia los focos de inflamación o neoplasias<sup>52</sup>. (Figura 4).

Las CMM poseen varias propiedades que las hacen muy interesantes para su utilización como vehículos virales antitumorales. En primer lugar, no producen una respuesta inmunitaria dirigida frente a sí mismas, por lo que



**Figura 4.** Actuación de las CMMs y su efecto en la mejoría de la viroterapia oncolítica. (1) CMM infectadas con VOs. (2) Las CMMs sirven como lugares de replicación a los VOs para producir más partículas virales. (3) Su capacidad de anidamiento y estatus inmunoprivilegiado permite a las CMMs acceder al tumor evitando la acción del sistema inmunitario sobre los VO que transportan. Una vez liberadas las partículas víricas infectan a las células tumorales y liberan señales quimiotácticas. (4) los VOs alteran el perfil de citoquinas de las CMMs. (5) las citoquinas inducen la migración y activación de células inmunitarias en el microambiente tumoral. (6) Activación de células NK. (7) Activación de CD. (8) Activación de linfocitos T frente a antígenos tumorales específicos. CMMs; células madre mesenquimales; VOs: virus oncolíticos; NK: natural killers; CD: Células dendríticas; DAMPs: patrones moleculares asociados a peligro; PAMPs: patrones moleculares asociados a patógeno; TAAs: antígenos asociados al tumor; TANs: neoantígenos asociados al tumor; MAT: macrófago asociado al tumor. Imagen modificada de Whan y col.<sup>57</sup>

son capaces de mantenerse viables durante varios días tras su administración local o sistémica gracias al efecto inmunosupresor producido por la expresión de citoquinas y otros factores que las permiten modular la respuesta inmunitaria celular e innata del hospedador<sup>53,54</sup>. Sin embargo, sí que ejercen un efecto sobre la respuesta inmunitaria, ya sea por su relación con el sistema celular o por la secreción de factores solubles y se ha demostrado que, *in vivo*, existe la posibilidad de que sean rechazadas por un huésped inmunocompetente<sup>55</sup>. Por otro lado, las CMM tienen una

excelente propiedad de anidamiento y biodistribución. Por estos motivos, las CMM infectadas con un virus oncolítico pueden ser utilizadas como un caballo de Troya que permite al agente oncolítico acceder al tumor sin ser inactivado por el sistema inmunitario tras su administración sistémica endovenosa<sup>56,57</sup>. (Figura 4).

Otra de las propiedades que les hace útiles en el tratamiento de tumores es que se ha demostrado que pueden actuar como células presentadoras de antígenos, modulando la respuesta inmunitaria frente al virus y al propio tumor<sup>56,58</sup>.

Las características fundamentales que hacen que un virus sea adecuado para su vehiculación en CMM son las siguientes:

- Ser capaz de infectar a la CMM a través de sus propios receptores (específicos del virus) que deben ser expresados por las CMMS.
- El ciclo de replicación del virus debe ser lo suficientemente largo para que las células infectadas puedan llegar hasta el tumor antes de que se produzca su lisis y la liberación de las partículas víricas. En el caso de las CMMS que vehiculan CRAds esta ventana es de 24 – 48 horas tras la infección<sup>59</sup>.
- Debe pasar desapercibido frente al sistema inmunitario durante el mayor tiempo posible mientras es vehiculado y, sin embargo, una vez liberados los CRAds deben de ser capaces de producir una fuerte respuesta inflamatoria local para promover el infiltrado leucocítico del tumor revirtiendo el estatus inmunosupresivo del mismo.
- Los CRAds no deben producir cambios fenotípicos o funcionales significativos sobre las CMMS infectadas<sup>60</sup>.

### CRAds vehiculizados con CMMs para el tratamiento de gliomas

Una de las dificultades más reconocidas para el tratamiento de los tumores cerebrales en general y del GBM en particular es la dificultad en el acceso al tumor por los fármacos quimioterápicos debido a la BHE, una membrana semipermeable altamente selectiva conformada fundamentalmente por células endoteliales unidas por uniones estrechas y los pies terminales de los astrocitos<sup>61</sup>. Se ha sugerido que las CMMS traspasan la BHE de manera muy similar a como lo hacen los leucocitos gracias a las interacciones entre las células endoteliales y la CMM<sup>62</sup>, pudiendo ser estos mecanismos facilitados mediante la administración de fármacos como el manitol o la irradiación previa<sup>63</sup>.

Una CMM infectada con CRAds capaz de acceder al glioma<sup>64</sup> permitiría, por un lado, la administración sistémica de los virus oncolíticos, evi-

tando los riesgos de la cirugía como método para su inoculación local (intratumoral), que ha sido el método empleado en la mayor parte de ensayos clínicos experimentales en humanos<sup>37,65</sup>. Por otro lado, la vehiculización de los virus por CMMS permitirá evitar su inactivación por parte del sistema inmunitario cuando son inoculados por vía sistémica<sup>66</sup>. Se ha demostrado, tanto *in vivo* como *in vitro*, que los gliomas son capaces de inducir una migración específica de CMMS hacia los mismos y, por lo tanto, pueden ser objeto de una terapia dirigida<sup>67,68</sup>. Este efecto se observó en ratones con xenoinjertos de células de glioma U87MG que tenían una replicación de virus intratumoral 46 veces mayor cuando se inyectaba el virus vehiculizado con una CMM que cuando se realizaba sin un vehículo<sup>66</sup>. Sin embargo, en otros estudios no se ha podido demostrar una replicación de un virus oncolítico (ICOVIR-17) en el cerebro de ratones con injertos de glioma U87-FmC tras ser tratados mediante administración intravascular de CMMS infectadas con ICOVIR-17 a diferencia de lo que ocurría tras su administración directa intracraneal<sup>69</sup>. No obstante, estos resultados negativos son cuestionables ya que existen otros estudios que prueban la eficacia de este tipo de tratamientos en condiciones experimentales muy similares<sup>70</sup>.

Otros estudios en humanos muestran que la inoculación intracraneal de células madre neurales infectadas con CRAd-S-pk7 en pacientes con gliomas de alto grado de reciente diagnóstico, era posible y segura con una supervivencia media similar a la de los pacientes tratados mediante las terapias convencionales<sup>71</sup>. La administración de CMMS como vehículos de ICOVIR-5 (combinación denominada Celyvir) vía sistémica como medida terapéutica en humanos, tanto adultos como niños con tumores avanzados (incluyendo tumores del SNC) ha demostrado ser un tratamiento seguro<sup>72</sup> y en la actualidad existen tres ensayos clínicos reclutando pacientes para comprobar su seguridad y eficacia. A pesar de que estos resultados son esperanzadores, no existen resultados de su eficacia en el tratamiento de gliomas en humanos, o en animales domésticos

cuando son administrados por vía sistémica, y es en este campo de investigación en el que se centrará esta tesis doctoral.

### Aplicación de los CRAds en el tratamiento de neoplasias caninas

Para el tratamiento de las neoplasias caninas se ha desarrollado un virus análogo al ICOVIR-17, denominado ICOCAV-17, modificado a partir del genoma del CAV-2<sup>43</sup>. Puesto que la estructura genética de este adenovirus canino es ligeramente diferente al adenovirus humano, se han realizado modificaciones análogas a las realizadas en el ICOVIR-17, pero con una delección menor en la proteína E1A (la que permite la especificidad de su replicación en células tumorales).

Este virus se ha utilizado de manera experimental en el tratamiento de ciertos tumores caninos con algunos resultados esperanzadores<sup>43</sup>. No obstante, el calendario vacunal de los perros en España (y en la mayor parte del mundo) incluye la vacunación rutinaria frente al CAV-2, virus que forma parte del proceso patológico conocido comúnmente como “tos de las perreras”. Esta es una patología muy frecuente, de curso autolimitante en la mayoría de las ocasiones<sup>73</sup>, que produce una reacción cruzada protectora frente al CAV-1, causante de hepatitis infecciosa frecuentemente mortal en animales jóvenes<sup>74</sup>. Debido a esta vacunación rutinaria los perros tienen una alta titulación de anticuerpos circulantes frente al CAV-2, que da lugar a una intensa respuesta inmunitaria frente al ICOCAV-17 cuando es administrado por vía sistémica, lo que probablemente causaría su inactivación antes de llegar al tejido diana. El equipo del Instituto de Salud Carlos III con el que colaboramos, ha diseñado un vehículo adecuado para que estos virus puedan alcanzar su destino sin ser atacados por el sistema inmunitario. Estos vehículos son CMM alogénicas (obtenidas a partir de grasa de perros sanos donantes) que fueron infectadas con ICOCAV-17. A esta combinación de células y virus se la ha denominado Celyvir canino o cCelyvir.

### Animales domésticos como modelos experimentales

Cada vez es mayor el número de investigadores que abogan por la aplicación de medidas terapéuticas experimentales en el tratamiento de los gliomas de alto grado en la especie canina, y la utilización de los resultados experimentales en el desarrollo de nuevas modalidades terapéuticas para esta enfermedad en medicina humana<sup>75,76</sup>. Esto se debe a dos motivos fundamentales:

- i. El desarrollo de las diferentes modalidades terapéuticas para el tratamiento de los gliomas de alto grado en la especie canina es mucho menor que en medicina humana, por lo que los métodos quirúrgicos avanzados o la radioterapia no están suficientemente consolidados en la medicina veterinaria. El tratamiento de elección en pacientes humanos afectados por gliomas de alto grado o GBM incluye la resección quirúrgica supramáxima (a mayor resección de volumen tumoral mejores expectativas de supervivencia) seguida de radioterapia y quimioterapia con temozolamida<sup>6</sup>. La instrumentación quirúrgica avanzada (microscopio quirúrgico, neuronavegación, marcadores tumorales fotoluminiscentes, así como la cirugía en paciente despierto) que permiten resecciones quirúrgicas más amplias en pacientes con gliomas, ha permitido una mejoría de los tiempos de supervivencia que, sin embargo, siguen siendo inferiores a dos años<sup>77,78</sup>. Estos condicionantes técnicos y la idiosincrasia de los pacientes en la clínica veterinaria hacen que los gliomas de alto grado en los perros tengan un pronóstico invariablemente fatal en un corto espacio de tiempo (< 2 meses) si no se aplican medidas terapéuticas específicas<sup>79,80</sup>. Aunque la radioterapia y la cirugía seguida de temozolamida han demostrado incrementar significativamente los tiempos de supervivencia de perros con gliomas cerebrales<sup>81,82</sup>, el desarrollo de nuevas modalidades de tratamiento de fácil administración podría mejorar la esperanza de vida de estos pacientes.

---

ii. Los pacientes caninos con gliomas de alto grado son un excelente modelo experimental ya que comparten los mismos factores biológicos, genéticos, fenotípicos, inmunológicos y clínicos que los humanos<sup>83,84</sup>. Estas semejanzas hacen que la aplicación de los resultados obtenidos en los pacientes caninos sea más fácil y rápidamente extrapolables a la población humana<sup>85</sup>. No obstante, se requerirá, además, la caracterización genética

o molecular rutinaria de los gliomas caninos, ya que se ha demostrado que, en gliomas humanos, la presencia de hipermetilaciones en el gen metilguanina-ADN metil-transferasa (MGMT), las mutaciones en el gen de la isocitrato deshidrogenasa 1 y 2 (IDH1 e IDH2) o la codeleción de los cromosomas 1p / 19q se relacionan con una mayor supervivencia, mientras que las mutaciones en los genes p53 y TERT se asocian a un peor pronóstico<sup>5</sup>.

---

## Objetivos del estudio

Los objetivos de la presente tesis doctoral son:

1. Evaluar la seguridad de cCelyvir administrado de forma intravenosa en perros con tumores espontáneos del sistema nervioso central (SNC), particularmente gliomas de alto grado.
2. Determinar la eficacia de cCelyvir administrado de forma intravenosa en perros con gliomas de alto grado.
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 presencia viral en el tumor.

## Material y métodos

### Pacientes caninos

El estudio clínico fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad Alfonso X el Sabio. Todos los propietarios de los perros incluidos firmaron un consentimiento informado. Los estudios preclínicos realizados en ratones fueron aprobados por el OEBA del Instituto de Salud Carlos III y la CAM de acuerdo con las directivas marcadas por la Unión Europea para animales de experimentación.

### Criterios para la selección de los casos

- a. En el proyecto de estudio se incluyeron perros con un diagnóstico presuntivo de glioma de alto grado realizado en base a los hallazgos en Resonancia Magnética (RM) de bajo campo (0.2T), siguiendo un protocolo estandarizado de acuerdo con las recomendaciones actuales para el diagnóstico de lesiones intracraneales en perros con equipos de RM bajo campo<sup>86,87</sup>. Para el diagnóstico radiológico de la lesión se requirió la revisión de, al menos, las siguientes secuencias:
  - Secuencia T2W en los planos sagital y transversal
  - Secuencia T1W en plano transversal y dorsal.
  - Secuencia FLAIR en plano dorsal
  - Secuencia T1W + Gd en planos transversal y dorsal
- b. El diagnóstico presuntivo también se pudo realizar mediante Tomografía Computarizada (TC), pero se requirió un estudio orevio de RM para que el paciente pudiera ser incluido en el estudio para realizar mediciones y seguimiento radiológico más preciso<sup>88</sup>.
- c. Los perros incluidos en el estudio debieron cumplir unos criterios diagnósticos en las pruebas de imagen (RM) para ser considerados pacientes con gliomas de alto grado, como son la presencia de una lesión única intra-axial con las siguientes características radiológicas<sup>88-91</sup>:

- Intensidad de señal variable en secuencias T1W pero más frecuentemente hipo / isointensidad.
- Intensidad de señal variable en secuencias T2W, frecuentemente hiperintensidad heterogénea.
- Hiperintensidad en secuencias FLAIR.
- En las secuencias T1W post contraste el realce podía ser leve, moderado, intenso o no aparecer en absoluto<sup>92</sup>. El realce podía a su vez presentarse de manera homogénea, heterogénea o en anillo alrededor de una cavidad de contenido necrótico en su interior.

Artículos recientes reconocen que la asociación entre las características radiológicas de la lesión y el tipo histológico específico (astrocitomas, oligodendrogliomas y la forma más agresiva de ambos, los glioblastomas) es débil, con una disparidad de resultados en los diferentes estudios realizados<sup>90,93</sup>. No obstante, se consideraron signos sugerentes de astrocitomas: la ausencia de contacto con sistema ventricular, la existencia de edema peritumoral extenso y la iso / hiperintensidad en secuencias T1W. Asimismo, se consideró como signo de mayor agresividad histopatológica, y por tanto, indicativo de glioma de alto grado, el realce intenso o en anillo<sup>90,91</sup>.

Puesto que no existen criterios radiológicos específicos definitivos que permitan discriminar los diferentes tipos de gliomas<sup>93</sup> el diagnóstico presuntivo fue de glioma, de alto grado si existía un realce intenso o en anillo con una cavidad necrótica en su interior. La tipificación y la determinación del grado histopatológico de la neoplasia se realizó gracias al estudio histopatológico del cerebro obtenido *post mortem*.

- d. La lesión debía estar localizada en el prosencéfalo (incluidos, por tanto, diencéfalo y hemisferios cerebrales).
- e. Todos los perros fueron sometidos a radiografías de tórax en 2 proyecciones así como a una ecografía abdominal para descartar la

presencia de otras lesiones neoplásicas y/o metástasis.

- f. El perro debía ser considerado sano en el momento de inicio del tratamiento (sin considerar el diagnóstico de glioma). Todos los pacientes con lesiones neoplásicas o inflamatorias concurrentes fueron excluidos del estudio.
- g. Los perros debían tener los valores del hemograma y bioquímica sanguínea en rangos fisiológicos. Sin embargo, una elevación moderada de transaminasas o ácidos biliares en pacientes tratados con corticoides y/o anti-convulsivantes se consideró aceptable, ya que éste es un fenómeno habitual en pacientes que toman esta medicación.
- h. El perro debía pesar al menos 4 kilos a fin de que se pudieran obtener muestras suficientes de sangre para las determinaciones analíticas requeridas en el estudio.
- i. Los perros deberían poder ser reevaluados radiológicamente mediante RM de control bajo las mismas condiciones que en el estudio que sirvió como diagnóstico pretratamiento para evaluar la evolución radiológica de la lesión. Si las condiciones clínicas del paciente lo permitiesen, los estudios de revisión de RM deberían realizarse inicialmente a los 2 meses del inicio del tratamiento con cCelyvir y dos nuevos estudios a los 4 y 6 meses.
- j. El tratamiento con cCelyvir debió iniciarse en un periodo de un mes tras la realización de la primera RM. El diagnóstico clínico o sospecha de la existencia de una lesión estructural cerebral podría haberse realizado anteriormente.
- k. El tratamiento con cCelyvir debía ser la única modalidad terapéutica utilizada en el tratamiento de los pacientes, con la salvedad de la utilización de antiepilépticos y/o corticoides que se pudieron utilizar como medida paliativa en caso de que el paciente manifestase convulsiones y/o edema cerebral. Aquellos propietarios que solicitaron tratamiento quimioterápico, radioterapia o cirugía para el

tratamiento de su mascota fueron excluidos del estudio.

- l. Los propietarios aceptaron cumplir con las revisiones seriadas y la donación del cadáver para su estudio anatomopatológico.
- m. Los propietarios de los perros aceptaron que participaban en un proyecto de investigación que no estaba completamente financiado, por lo que asumieron ciertos gastos clínicos (medicación, análisis de sangre urgentes, hospitalización, etc...).

### Criterios de exclusión

- Perros con múltiples lesiones cerebrales (incluidos gliomas múltiples o gliomatosis cerebral).
- Perros con gliomas caudotentoriales o en fosa craneal caudal (con afección de mesencéfalo, puente, médula oblonga y/o cerebelo).
- Perros en tratamiento con inmunosupresores u otras formas de tratamiento para el glioma (quirúrgico, radioterápico o quimioterápico).
- Perros con otras enfermedades graves, entendiendo como tales aquellas enfermedades en las que a los pacientes no se les supusiera una supervivencia media mayor a 6 meses.
- Existencia de otras neoplasias (excluidas aquellas neoplasias previas de carácter benigno que fueron extirpadas en su totalidad y con el paciente curado de las mismas).
- Cuando el resultado histopatológico *post mortem* de la lesión no fuese el de glioma de alto grado.

### Recogida de datos

Se registraron los datos de cada paciente incluyendo la reseña del animal (raza, edad, sexo y peso), historia clínica previa o antecedentes, fechas de las vacunaciones y tipo de vacunas usadas que incluyeran la vacuna frente a adenovirus canino, examen físico y examen neurológico (tanto inicial como en las revisiones) en el que se determinaba la localización neuroanatómica de la lesión.

Se determinaron además las fechas de inicio de la sintomatología clínica, del diagnóstico, de los procedimientos realizados y tiempo de duración del tratamiento con cCelyvir desde el día de la primera administración hasta la muerte, así como el número de dosis administradas.

Durante el tratamiento se registró la calidad de vida del paciente percibida por los propietarios mediante una escala analógica visual en la que se estableció una línea de 10 cms. marcada únicamente en los extremos en la que el propietario tenía que marcar la calidad de vida percibida de su mascota entre el extremo izquierdo de la línea (0, no puede estar peor) y el extremo derecho (10, no puede estar mejor). El punto de la marca y su distancia en cms. del extremo izquierdo o punto 0 se correspondería con una valoración de 0 a 10 en la calidad de vida del paciente.

También se registró el tiempo de supervivencia (en días) hasta el momento de la muerte desde: a) el inicio de los signos clínicos, b) el diagnóstico y c) el inicio del tratamiento con cCelyvir.

Finalmente se registró, además, el tiempo entre el diagnóstico y el inicio del tratamiento.

### Preparación del tratamiento (Celyvir canino o cCelyvir)

La obtención de CMMs caninas se realizó de acuerdo con la metodología previamente descrita por nuestro grupo de investigación<sup>94</sup>. De manera resumida: se obtuvo tejido adiposo de perros donantes sanos (sin patología inflamatoria, infecciosa o neoplásica) sometidos a intervenciones electivas rutinarias (ovariohisterectomía u orquiectomía) que fue digerido con colagenasa IV (Sigma-Aldrich), filtrado a través de una malla de nylon de 70µm (Fisher Scientific) y cultivado posteriormente en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*, FBS), 1% glutamina, estreptomicina (100 mg/ml) y penicilina (100 U/mL) a 37°C en atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células no adheridas se eliminaron con sucesivos pases del cultivo para obtener un cultivo homogéneo de CMM en el que se descartó la

existencia de *Mycoplasma* mediante técnicas de luminiscencia por reacción enzimática específica (*Mycoalert Mycoplasma Detection Kit*, Lonza). La preparación de cCelyvir consistió en la infección *in vitro* de CMMs con el adenovirus replicativo condicional ICOCAV-17 con una multiplicidad de infección de 1 durante una hora. Las CMMs infectadas se lavaron 3 veces con solución salina tampón fosfato (*Phosphate Buffered Saline*, PBS), se filtraron y diluyeron en tampón salino para su infusión endovenosa.

Para las pruebas de infectividad de las CMMs se sembraron placas de 96 pocillos. Tras 24 horas, las células fueron infectadas por triplicado con diluciones seriadas de ICOCAV-17. Tras 24 horas el medio de cultivo fue retirado y se realizó una tinción por inmunocitoquímica frente a la proteína del hexon de acuerdo al método descrito previamente para determinar el título viral obtenido<sup>95,96</sup>.

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron sembrando las CMMs en placas de 96 pocillos con DMEM con 10% FBS. Estas células fueron infectadas con diluciones seriadas de CAV-2 o CAVRGD empezando con 1000 unidades de transfección (UT) por célula. Entre 6 y 8 días después de la infección las placas se lavaron con PBS y se determinó la cantidad de proteína total con medidas de absorbancia. El contenido proteico de los vectores adenovirales se confirmó con una tinción de nitrato de plata de proteínas desnaturalizadas integradas en un gel SDS-poliacrilamida y se midió cuantitativamente con un análisis de densidad óptica (*Quantity One software*, Bio-Rad)<sup>96</sup>. Para la producción del virus las CMMs fueron infectadas y tras 4 horas el medio se retiró y las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con un nuevo medio. Tanto las células como el medio fueron recogidos 48 horas tras la infección y sometidos a tres rondas de lisis mediante congelación y descongelación. Los títulos virales de los extractos celulares se determinaron por triplicado siguiendo un método de tinción frente a la proteína del hexon en células DKCre siguiendo las guías anteriormente publicadas<sup>95</sup>.

## Protocolo terapéutico con cCelyvir

El cCelyvir se administró en dosis de  $0.5 \times 10^6$  células infectadas por kilo de peso durante 45 minutos a través de una vía venosa periférica. Se anotó la extremidad en la que se administró el fármaco en cada sesión. Tras la primera administración de cCelyvir los perros se mantuvieron bajo estrecha vigilancia hospitalaria y monitorización constante de la frecuencia cardíaca, respiratoria, temperatura y estado general durante 6 horas. No obstante, para evitar posibles reacciones anafilácticas a la administración del cCelyvir los pacientes se pre-trataron con metamizol (30mg/kg/IV) y difenhidramina (0.5mg/kg/IV). Todos los perros recibieron una dosis semanal de cCelyvir durante ocho semanas a menos de que se detectasen efectos adversos.

Se determinó que se cancelase la administración del fármaco si algún paciente sufriese una alteración analítica grave, considerándose como tales las siguientes:

- Leucocitosis:  $> 30^3$  células/ $\mu$ L.
- Trombocitopenia:  $<10^6$  células/ $\mu$ L.
- Anemia por debajo de 20% de hematocrito.
- Aumento de creatinina:  $>2$ mg/dL.
- Aumento de ácidos biliares por encima de 35md/dL en pacientes con signos de hepatopatía.
- Hipoalbuminemia por debajo de 1.5 g/dL.

En el momento del diagnóstico todos los pacientes recibieron un tratamiento con corticoides a dosis decreciente durante un mes. La dosis inicial fue de 0.5mg/kg/12 horas durante una semana para reducir a 0.25mg/kg/12 horas la semana siguiente, 0.25mg/kg/24 horas la siguiente y finalmente 0.25mg/kg/48 horas durante una semana más para finalmente ser retirado. Se administró además fenobarbital a 2.5mg/kg/12 horas si el paciente sufría o desarrolló convulsiones durante el tratamiento como consecuencia de su lesión intracraneal. Las dosis de corticoides y fenobarbital se modificaron de acuerdo a las necesidades del paciente siguiendo los criterios

del veterinario. Se administraron, además, uno o varios bolos de manitol (1gr/kg) en 15 minutos en los pacientes que tuvieran alteraciones radiológicas (desviación severa de la línea media, edema cerebral severo, herniación rostrorotatoria o a través de foramen magno) o clínicas compatibles con un aumento de la presión intracraneal (alteraciones en reflejo o tamaño pupilar, edema de papila o deterioro súbito del nivel de consciencia) en el momento del diagnóstico o en algún momento del curso clínico de la enfermedad.

Tras la octava dosis de cCelyvir (2 meses después del inicio del tratamiento) se realizó una RM de revisión y se estableció un protocolo de tratamiento nuevo en función del estado clínico del paciente siguiendo los criterios que se siguen en la evaluación de la respuesta en neurooncología veterinaria (*Response Assesment on Veterinary Neurooncology*, RAVNO)<sup>97</sup>. Siguiendo este criterio se consideraron los siguientes 4 estados clínicos:

- a. Respuesta completa
  - a. Eliminación de todo el tumor captante de contraste.
  - b. Márgenes de la lesión estables o disminuidos en secuencias T2W y FLAIR.
  - c. Ausencia de nuevas lesiones.
  - d. Mejoría o estabilización del estado clínico sin administración de corticoides.
- b. Respuesta parcial
  - a. Eliminación de  $>50\%$  del tumor captante de contraste.
  - b. Márgenes de la lesión estables o disminuidos en secuencias T2W y FLAIR.
  - c. Ausencia de nuevas lesiones.
  - d. Mejoría o estabilización del estado clínico.
- c. Enfermedad estable
  - a. Reducción  $<50\%$  o aumento  $<25\%$  del volumen del tumor captante de contraste.
  - b. Márgenes de la lesión estables o disminuidos en secuencias T2W y FLAIR.

- c. Ausencia de nuevas lesiones.
  - d. Mejoría o estabilización del estado clínico pero necesitando la administración de una dosis estable o decreciente de corticoides.
- d. Enfermedad progresiva
- a. >25% de aumento en el tamaño de la lesión.
  - b. Aumento de los márgenes de la lesión en secuencias T2W y FLAIR.
  - c. Presencia de nuevas lesiones.
  - d. Deterioro clínico.

A los perros sin respuesta al tratamiento (enfermedad progresiva) se les mantuvo únicamente con tratamiento paliativo ya que se asumió la ineficacia de cCelyvir mientras que aquellos con respuesta parcial o enfermedad estable que se encontraban en buenas condiciones físicas se les incluyó en un segundo ciclo de tratamiento con administración de cCelyvir cada 2 semanas (**Figura 5**).

### Análisis hematológicos

Se obtuvieron muestras de sangre mediante venopunción de las venas cefálica, safena o yugular con aguja de 23G según las condiciones y posibilidades de cada paciente, para la realización de una analítica completa, previa a cada ciclo de tratamiento, y a las 24, 48 y 72 horas tras la primera inyección de cCelyvir, así como en cualquier momento del estudio en que el paciente mostrase un deterioro clínico. Se determinaron además los niveles de fenobarbital según los requerimientos clínicos para ajustar las dosis administradas. Las muestras se conservaron en tres tipos de tubos pretratados, uno de ellos con heparina, otro con EDTA y el tercero con citrato. Las analíticas completas incluyeron hemograma y bioquímica completa. Específicamente los parámetros medidos fueron:

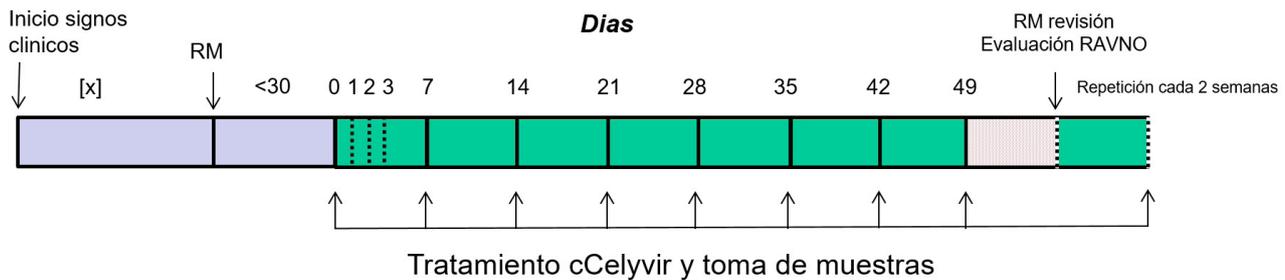
- Hemograma: hematíes ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ), hematocrito (%), hemoglobina (g/dL), Volumen corpuscular medio (*mean corpuscular volumen*, MCV; femtolitro, fl), Concentración de hemoglobina corpuscular media (*mean corpus-*

*cular hemoglobin concentration*, MCHC; g/dl), Hemoglobina corpuscular media (*mean corpuscular hemoglobin*, MCH; picogramos, pg), distribución de tamaño de los glóbulos rojos (*red cell distribution width*, RCW; %), 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 platelet volume*, MPV; fl) y distribución de tamaño plaquetar (*platelets distribution width*, PDW.; %).

- 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) y BUN (mg/dL), creatinina (mg/dL).
- Proteínas: proteínas totales (g/dL), albúmina (g/dL) e globulinas (g/dL), índice albúmina/globulinas.
- Parámetros hepáticos: fosfatasa alcalina (U/L) y GOT (AST) (U/L) y GPT (ALT) (U/L) y ácidos biliares.

### Seguimiento clínico

En todos los pacientes se evaluó su reseña, peso corporal, historia médica previa, hallazgos del examen neurológico y estatus vacunal. Previamente a la administración de cada dosis de cCelyvir, los perros fueron monitorizados exhaustivamente mediante la realización de examen físico y neurológico completo para determinar la condición del perro y los posibles déficits neurológicos. La calidad de vida del perro (establecida en una escala numérica entre el 1 y el 10 de acuerdo con la percepción del propietario) también fue registrada. Los efectos adversos derivados o relacionados con la administración de cCelyvir fueron registrados siguiendo los criterios estandarizados del grupo cooperativo de oncología veterinaria para establecer el criterio común de terminología de efectos adversos en perros y gatos (*Veterinary cooperative oncology*



**Figura 5.** Cronograma del tratamiento, toma de muestras y RM de revisión de los pacientes sometidos a tratamiento con cCelyvir.

group for common terminology criteria of adverse events in dogs and cats, VCOG – CTCAE)<sup>98</sup>. Se consideraron aquellos síntomas clínicos o alteraciones clínicas que aparecieran dentro de las 48 horas siguientes a la administración del medicamento. Estas alteraciones podrían ser:

- Alteraciones en el examen físico: fiebre, taquicardia, taquipnea o jadeo intenso.
- Nuevas alteraciones neurológicas y/o del comportamiento.
- Dolor: local (punto de inoculación o distante a la misma, debiéndose especificar el punto afectado) o generalizado.
- Alteraciones dermatológicas: prurito, eritema, pápulas, etc.
- Alteraciones digestivas: vómitos, diarrea, estreñimiento, cambios de coloración de las heces, anorexia, etc.
- Alteraciones en cualquier otro sistema: ojos, piel, musculoesquelético, etc.
- Alteraciones analíticas.

Todos los perros fueron seguidos hasta el momento de su muerte. El tipo y causa de la muerte se registró y clasificó como muerte natural relacionada con el tumor (deterioro neurológico severo) o eutanasia a petición del propietario cuando la calidad de vida se percibió como mala o nula o existieran otros condicionantes como efectos secundarios de la medicación, aparición de otras enfermedades o por causas económicas. Únicamente se realizó eutanasia por motivos humanitarios, y siempre

siguiendo el criterio del veterinario responsable. Se solicitó la autorización del propietario mediante un consentimiento informado y firmado de eutanasia. 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 barbitúrico (Pentobarbital sódico).

Inmediatamente tras la muerte del paciente (ya fuese natural o tras la eutanasia) se realizó la necropsia. El cerebro completo fue extraído durante las primeras 24 horas y se obtuvieron muestras de 1cm<sup>2</sup> del tumor, del hemisferio contralateral sano y del hígado para ser congeladas. El resto del cerebro y tumor, así como hígado fueron fijados y conservados en formol al 10%. Las muestras fueron fijadas para realizar estudios inmunohistoquímicos o congeladas para analizar la expresión de ARN mediante estudios de arrays genéticos.

### Evaluación radiológica de las lesiones

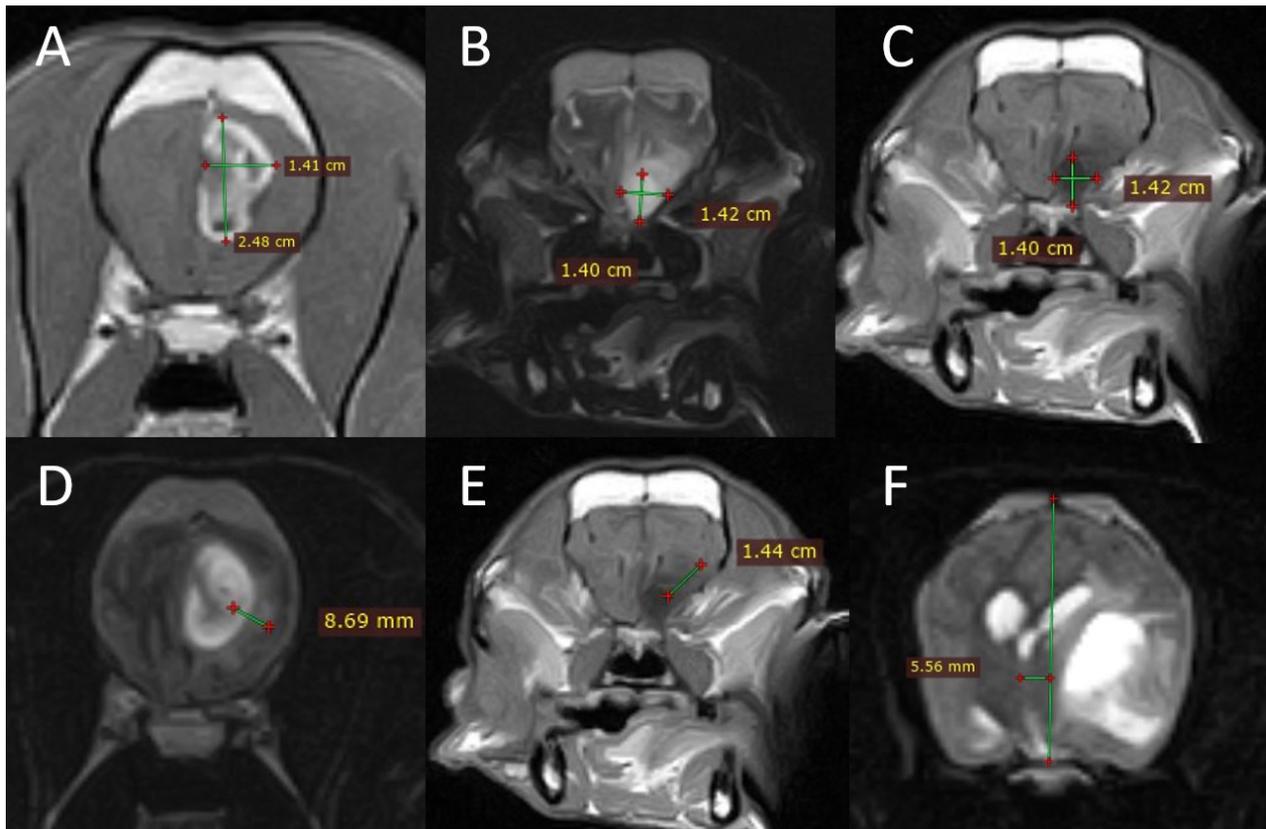
Las lesiones, tanto en los estudios iniciales como en los de revisión, se caracterizaron de acuerdo a los siguientes parámetros:

- Localización:
  - Lóbulo/s afectado/s (frontal, parietal, temporal y occipital) o diencefalo (región supraselar o talámica).
  - Lado (izquierdo y/o derecho).
  - Afección de sustancia blanca, sustancia gris o ambas.

- Forma: lineal, esférica u ovoide.
  - Patrón de crecimiento: compresivo o infiltrativo.
  - Márgenes: definidos (regulares o irregulares) o difusos.
  - Características de señal:
    - Hiper, iso o hipointensidad en secuencias T2W, T1W y FLAIR en relación con la sustancia gris cortical normal.
    - Homogeneidad de señal: heterogeneidad u homogeneidad en secuencias T2W, T1W y FLAIR. Para ser considerado homogéneo todo el tumor debía presentar la misma intensidad de señal.
  - Realce de la lesión en secuencias T1W + Gd. En la imagen donde se observó el mayor grado de realce.
    - Intensidad: ausente, leve, moderado, severo. Esta consideración fue subjetiva.
    - Homogeneidad de realce: heterogéneo, homogéneo o en anillo.
  - Edema perilesional (hipointensidad en secuencias T1W e hiperintensidad en T2W y FLAIR):
    - Ausente: no se observaron signos radiológicos de edema.
    - Moderado: si solo se veía afectada una división encefálica (un lóbulo cerebral o el tálamo).
    - Severo: cuando se vieron afectadas múltiples áreas encefálicas (varios lóbulos cerebrales y/o tálamo).
  - Efecto masa evidenciado en función de las siguientes características (Figura 6):
    - Desviación de la línea media calculada como la máxima desviación entre un eje vertical comenzando en el seno sagital que se extiende a lo largo de la línea media hasta la base del cráneo y una línea perpendicular creada entre esta línea vertical y el punto de máxima desviación de la línea media.
    - Colapso o dilatación ventricular, especificándose si existía colapso de las vías de drenaje de LCR.
    - Herniación cerebral: subfalcina, transtentorial o a través del foramen magno.
  - Presencia o ausencia de regiones quísticas (áreas o cavidades bien delimitada de contenido de señal de líquido cefalorraquídeo) o cavidades necróticas (área irregular con bordes mal definidos).
- El tamaño de las lesiones se determinó en base a la imagen transversal en secuencias T1W + Gd donde la lesión tuviese el mayor tamaño. En esta imagen se delimitaron los dos ejes perpendiculares mayores. El producto de ambos ejes constituirá el tamaño máximo de la lesión medido en cm<sup>2</sup> (Figura 6). Siguiendo los criterios RAVNO se debieron considerar diversas condiciones: a) la lesión debía realizarse en las secuencias T1W + Gd, b) se debían excluir lesiones de <10mm de diámetro y c) se debían excluir áreas quísticas o necróticas<sup>97</sup>. Sin embargo, dado que muchos de los tumores eran de pequeño tamaño se decidió hacer las determinaciones de volumen, a pesar de que alguno de los diámetros fuese menor de 10mm, algo muy frecuente en los gliomas caninos<sup>99</sup>. Por otro lado, cuando el tumor no realizaba de manera significativa, se decidió realizar la medicación del tumor en base a los límites de la lesión medida en secuencias T2W ya que se ha descrito que esta secuencia es más precisa para evaluar los límites de la lesión, tal y como se hace en las mediciones de los gliomas de bajo grado en medicina humana y veterinaria<sup>99,100</sup>. Se decidió realizar mediciones lineales y no volumétricas debido a la mayor facilidad en su realización, siendo ambas técnicas equiparables en su eficacia para determinar la respuesta a un tratamiento<sup>99</sup>.

### Estudios histopatológicos

Los tejidos obtenidos en las necropsias fueron fijados en formol al 10% durante 24 horas. Las muestras fueron lavadas con PBS y deshidratadas progresivamente con inmersión en baños de alcohol y xileno antes de ser incluidas en parafina.



**Figura 6.** Imágenes transversales representativas obtenidas mediante RM que muestran la medición de las lesiones y sus características radiológicas. (A) Medición del área de la masa, siendo el producto de los diámetros perpendiculares mayores de la masa a través de la lesión, realizada en un plano transversal en una secuencia T1W poscontraste. En lesiones que no se realizaron, las secuencias T2W (B) y T1W (C) fueron consideradas para evaluar las alteraciones en la morfología del tejido normal lo que permitió, de manera aproximada, establecer el tamaño de la masa. Obsérvese el edema peritumoral en las imágenes D y E evidenciado como el área (de señal hiperintensa en secuencias T2W e hipointensa en secuencias T1W) peritumoral que agrava el efecto masa de la lesión. F) Se ilustra la medición de la desviación de la línea media.

La evaluación morfológica se realizó con cortes de 5µm teñidos con hematoxilina y eosina. Los tumores fueron clasificados de acuerdo a sus características morfológicas siguiendo los criterios para la clasificación de tumores del SNC en humanos establecidos en 2007 por la organización mundial de la salud<sup>101</sup> y sus actualizaciones de 2016 y 2021<sup>2,102</sup> y su adaptación para tumores caninos<sup>103</sup>. Además, se consideró una revisión reciente para la validación de los pacientes caninos con gliomas de aparición natural como modelos preclínicos de gliomas humanos<sup>104</sup>.

En las preparaciones histológicas se evaluó la presencia o ausencia de necrosis, degradación de la matriz extracelular, proliferación vascular y/o hemorragia. Estos parámetros se clasificaron como leves, moderados o severos y fueron

comparados con los obtenidos en gliomas no tratados almacenados en el banco de tejidos de la Unitat de Patologia Murina i Comparada (UP-MiC) de la Universidad Autònoma de Barcelona.

### Estudios inmunohistoquímicos

Las secciones del tumor de 5µm montadas en portas fueron desparafinadas y lavadas con agua. Para bloquear la peroxidasa endógena se inactivó con peróxido de hidrogeno al 3% durante 35 minutos. La unión inespecífica fue bloqueada con suero normal de cabra al 30% diluido con PBS durante una hora a temperatura ambiente. Una vez realizado este proceso, las muestras fueron incubadas por la noche con anticuerpos primarios a 4°C. Las secciones se lavaron con PBS y se incubaron durante 40 minutos a temperatura

ambiente con un polímero marcado de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Dako REAL Envision-HRP). La tinción se completó con una incubación de 10 minutos con 3'-diaminobenzidina y contratinción con hematoxilina durante 3 segundos. Se determinó la presencia de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y el factor de transcripción de oligodendrocítico 2 (Olig2) así como población de TILs de tipo CD3 y CD20 (marcadores proteicos de superficie celular de linfocitos T y linfocitos B respectivamente) y FOXP3 (factor de transcripción nuclear expresado en el núcleo de linfocitos T reguladores). Los controles positivos para los anticuerpos CD3, CD20 y FOXP3 fueron tejido linfoide canino normal. Para el control negativo se utilizó una inmunoglobulina isotipo específica en sustitución del anticuerpo primario. Los anticuerpos primarios utilizados, el proveedor y las diluciones están resumidas en la **tabla 1**.

Las placas teñidas del tumor fueron digitalizadas mediante un software de análisis específico de imágenes (*NanoZoomer Digital Pathology-view 2*; Hamamatsu, Japón). En cada sección se identificó el área con mayor concentración de células marcadas y, en ellas, se seleccionaron 5 áreas redondas de 0.257mm<sup>2</sup> para la cuantificación bajo magnifi-

cación 40x. Las áreas se centraron en regiones con alta población tumoral evitando áreas de necrosis o hemorragias, pero también sobre regiones altamente infiltrativas en la unión entre el parénquima sano y el tumor. Un anatomopatólogo entrenado determinó manualmente el número de linfocitos CD3<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup> y FOXP3<sup>+</sup> en cada área y se estableció una media entre todas las áreas, concluyéndose finalmente el número de células positivas por 0.257mm<sup>2</sup> de superficie de tejido.

### Análisis de citoquinas

Se obtuvieron muestras de sangre según el calendario previsto los días 0,1,2,3 y previamente a cada infusión de cCelyvir (**Imagen 5**). Las muestras se recogieron en tubos para separación de suero que fue congelado a -20°C para posteriormente realizar la cuantificación de interleucinas (IL)-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-15, IL-18, interferón (IFN)- $\gamma$ , ligando de quimiocina 10 (CXCL10), factor estimulante de colonias granulocitos-macrófagos (GM-CSF), ligando de quimiocina CC (CCL)2 y quimiocina derivada de keratinocitos (KC)-like utilizando un sistema multiplexado (*Milliplex MAP Canine Cytokine / Chemokine Magnetic Bead Panel*, Millipore,

Antígeno	Anticuerpo	Proveedor	Dilución	Pretratamiento	Células marcadas
CD3	Policlonal antihumano de conejo	Dako A0452	1:100	Proteasa 0.1% en PBS 8 minutos a 37°C	Linfocitos T
CD20	Policlonal antihumano de conejo	Thermo Fisher PA5-32313	1:300	Buffer citrato 10mM pH 6.0. 20 minutos al baño maria a 96°C	Liinfocitos B
FOXP3	Monoclonal antihumano de ratón	eBioscience 14-7979	1:100	Tris-EDTA 11mM pH 9.0. 20 minutos al baño maria a 96°C	Linfocitos T reguladores
GFAP	Antibovino proteína ácida fibrilar glial de conejo	Dako, Dinmarca Z0334	1:500	Buffer citrato 10mM pH 6.0 30 minutos a temperatura ambiente	Astroцитos
Olig2	Antígeno, tipo de anticuerpo policlonal Olig2 de conejo	Merck Milipore AB9610	1:100	Buffer citrato 10mM pH 6.0. 30 minutos a temperatura ambiente	Oligodendrocitos

**Tabla 1.** Antígeno, tipo de anticuerpo, proveedor, dilución, pretratamiento y marcado celular del estudio inmunohistoquímico.

Darmstads, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante y utilizando tecnología Luminex.

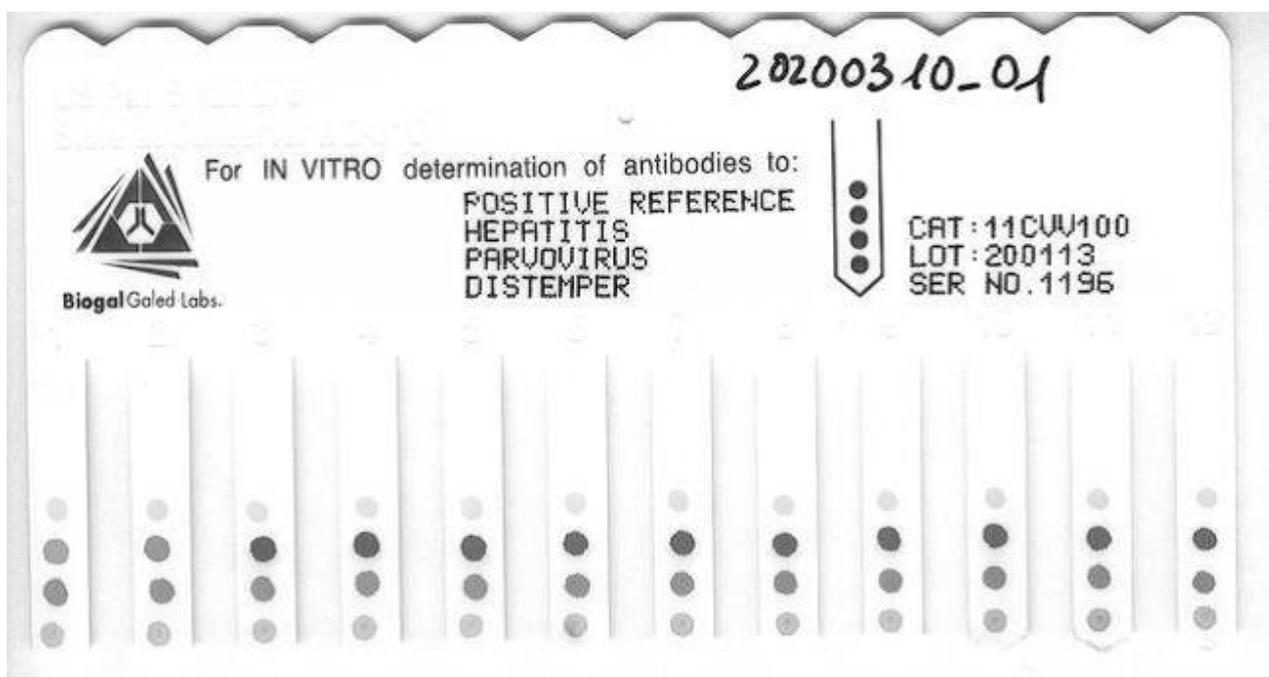
### Determinación de anticuerpos anti-adenovirus

Las muestras de sangre se obtuvieron según el calendario previsto. Los tubos se centrifugaron a 200rpm durante 10 minutos para la obtención del plasma que fue congelado a -20°C hasta su análisis. Se determinó la existencia de anticuerpos (IgG) frente a adenovirus canino mediante un ELISA de fase sólida (*InmunoComb Canine VacciCheck*, Biogal Galed Laboratories Acs; Kibbutz Galed, Israel) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificaron en unidades arbitrarias siguiendo un protocolo ya descrito<sup>94</sup>. Las muestras de sangre entera (10µl) o suero (5µl) se dispensaron en las placas de desarrollo. El ensayo se realizó a temperatura ambiente siguiendo las instrucciones del fabricante. Las imágenes de InmunoComb se digitalizaron y las densidades de puntos fueron cuantificadas utilizando un software Imagen Lab 5.0 (Bio-Rad) (Figura 7).

En cada tira individual del peine se obtuvo una marca colorimétrica de control para asegurar que el ELISA se había desarrollado adecuadamente. 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 puntos de la muestra – intensidad media del fondo de la muestra) – (intensidad de puntos de la referencia positiva – intensidad media de puntos del fondo de la referencia positiva).

### Cuantificación por qPCR de genomas adenovirales

Las muestras de sangre fueron recogidas en tubos específicos (*tubos PAXgene Blood DNA*) y procesadas siguiendo las instrucciones del fabricante del *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Quiagen; Madrid, España). Las muestras de tejido tumoral y tejido sano contralateral fueron congeladas en seco a -80°C. Los tejidos se introdujeron en cilindro de metal sumergido en nitrógeno líquido para posteriormente ser molidos con un mortero de mano hasta que



**Figura 7.** 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 parvovirus) y distemper (causante del moquillo canino).

fueron pulverizados por completo. El ADN se aisló con el *QIAamp DNA Mini Kit* (Quiagen; Madrid, España). Se utilizaron entre 30 y 40mg de cada muestra para la cuantificación y pureza del ADN (A260/280 y A260/230 mediante espectrofotometría (Nanodrop 2000; Thermo Scientific). Se realizó una curva estándar preparada en base a diluciones seriadas de ICOCAV-17 de entre  $10^8$  y  $10^9$  partículas víricas / mL utilizando sangre de donantes sanos como diluyente. La extracción del ADN se realizó siguiendo los pasos anteriormente descritos. Las muestras de ADN purificado fueron analizadas por la determinación cuantitativa de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (*Quantitative Polymerase Chain Reaction-Real Time*, qPCR-RT) usando el 7500 Fast qRT-PCR (Applied Biosystem; Madrid, España). Se utilizó el Premix Ex Taq (Clontech Laboratories; Saint-Germain-en-Laye, Francia), primer forward (0.5  $\mu\text{mol/L}$ ) 5' TGTGGGCCTGTGTGATTCCT-3', primer reverse (0.5  $\mu\text{mol/L}$ ) 5'-CCAGAATCAGCCTGAGTGCTC-3' y 10pmol de Taqman probe FAM-CTCGAATCAGTGTCAGGCTCCGCA-TAMRA que identificó la región E1A. Las condiciones para la qPCR-RT fueron de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Se analizaron los datos obtenidos con el software 7500 V.2.0.6 (Applied Biosystem). El número de partículas virales detectado fue extrapolado a la curva estándar para cuantificar el número de copias de ICOCAV-17 en las muestras, y a continuación, se calculó la media de los triplicados.

### Análisis por citometría de flujo de poblaciones leucocitarias

De las muestras obtenidas de sangre periférica, una parte se centrifugó y se criopreservaron las células con FBS y dimetilsulfoxido (DMSO) para el posterior análisis del fenotipado celular en sangre periférica a lo largo del estudio. Las muestras se mantuvieron criopreservadas en nitrógeno líquido a una temperatura de -196°C hasta su análisis por citometría de flujo. Las muestras se incubaron con FCR blocking humano durante 10 minutos a temperatura ambiente y se reincubaron durante 20 minutos a 4°C con anticuerpos conjugados directamente diluidos en PBS con 1% FBS. Para el estudio de las diferentes poblaciones celulares

se incubaron 30  $\mu\text{L}$  de sangre por tubo en medio para lisar eritrocitos (*Quicklysis buffer*; Cytognos; Salamanca, España).

Las suspensiones del tumor se obtuvieron tras disgregación mecánica seguido de una disgregación enzimática con colagenasa D a 1mg/mL (Roche) en solución salina balanceada de Hanks (*Hanks Balanced Salt Solution*, HBSS) con  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (Lonza), 2% FBS durante una hora a 37°C. Las suspensiones celulares se filtraron a través de una malla de retención celular de nylon de 70 $\mu\text{m}$  (Fisher Scientific) y los eritrocitos lisados con tampón Quicklysis. Se utilizaron los anticuerpos descritos en la [tabla 2](#). La adquisición de datos se realizó en un MacsQuant10 Flow Cytometer (Miltenyi).

### Análisis de infiltrado inmune intratumoral por CIBERSORT

Las muestras de tumor y de tejido sano cerebral contralateral se congelaron a -80°C. Los tejidos se introdujeron en cilindro de metal sumergido en nitrógeno líquido para posteriormente ser molidos con un mortero de mano hasta que fueron pulverizados por completo. Se utilizaron 40mg de cada muestra para extraer el ARN utilizando el *RNA easy Mini Kit* (Quiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cuantificación de ARN se realizó con espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). La integridad del ARN se analizó con el Bioanalyzer RNA 6000 Nano y aquellas muestras con valores RIN mayores de 8.6 fueron utilizadas. La expresión de ARN se analizó mediante el *Array GeneChip Canine Gene V.1.0 ST array* (Affymetrix). Los datos se analizaron utilizando el software *Transcriptome Analysis Console*. Las fracciones de leucocitos infiltrativos tumorales de 6 pacientes se calcularon a partir de la expresión de ARN en bruto utilizando un algoritmo CIBERSORT siguiendo las guías ya publicadas<sup>105</sup>. La matriz de expresión del microarray de los tumores caninos fue procesada previamente para equipararlas con identificadores genéticos humanos con ortólogos caninos. La infiltración de leucocitos se estimó utilizando una matriz validada de un registro

genético de leucocitos (LM22). Los ortólogos caninos se equipararon en un 85% con esta matriz LM22. El análisis se realizó en modo relativo con 100 ciclos de permutaciones sin normalización cuantil. Las fracciones celulares resultantes se agruparon pasando de 22 a 11 tipos celulares basándose en su linaje tal y como se ha descrito en la literatura<sup>105</sup>.

### Análisis estadístico

Se analizaron los datos y crearon las gráficas con una hoja de cálculo de Excel 2013 (Microsoft Office 2013) y GraphPad Prism (GraphPad Sof-

ware). Se realizaron comparaciones entre las variables cuantitativas con una distribución normal mediante un test de Wilcoxon. Si las variables no seguían una distribución normal se realizó un test de Mann-Whitney. Las diferencias se consideraron significativas con \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$  y \*\*\*  $p < 0,001$ . Para determinar la asociación estadística entre dos variables continuas (como por ejemplo la relación entre el volumen del tumor y el tiempo de supervivencia) se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson. El análisis de varianza de dos vías y los test de comparaciones múltiples de Bonferroni fueron utilizados para analizar los resultados del CIBERSORT.

Antígeno	Especie	Clon	Proveedor
CD90	Perro	YKIX337.217	AbDserotec
CD29	Perro	MEM-101A	eBioscience
CD73	Perro	7G2	eBioscience
MHCII	Perro	YKIX334.2	AbDserotec
CD3	Perro	CA17.2A12	AbDserotec
CD11	Perro	XYKIX490.6.4	AbDserotec
CD45	Perro	YKIX716.13	AbDserotec
CD4	Perro	YKIX302.9	AbDserotec
CD8	Perro	YCATE55.9	AbDserotec
CD25	Perro	P4A10	AbDserotec
CD21	Perro	CA2.1D6	Biorad
CD5	Perro	YKIX322.3	eBioscience
CD44	Humano / ratón	IM7	eBioscience
CD14	Humano	61D3	BD Pharm

**Tabla 2.** Anticuerpos utilizados en la citometría de flujo.

## Resultados

### Pacientes incluidos y estado clínico

Diez perros cumplieron los criterios de inclusión para el estudio. La edad media fue de 8 años (rango 6 – 10 años). Todos fueron razas braquicéfalas (6 bulldog francés, 2 bóxer y un bulldog inglés) salvo uno que era un caniche (Figura 8). Siete perros eran machos y 3 hembras. El peso medio fue de 17 kilos (rango entre 4.4 y 38.8 kilos). Todos ellos estaban vacunados frente a Adenovirus tipo II (CAV-2) con una media de tiempo desde la última vacunación de 8 meses (rango entre 1 y 35 meses) (Tabla 3).

Todos los pacientes mostraron convulsiones como signo clínico principal en el momento del diagnóstico y 7 de ellos, además, manifestaron déficits neurológicos indicativos de afección prosencefálica (alteración del estado mental, hemiparesia contralateral a la lesión y/o déficits en reacción de amenaza o sensibilidad consciente contralateral). El tiempo medio desde la aparición de los signos clínicos hasta el diagnóstico fue de 40 días (Tabla 3). Todos los perros reci-

bieron prednisona como método de tratamiento paliativo durante un mes y fue ajustado en función de los requerimientos clínicos de manera variable. Nueve de los perros recibieron, además, fenobarbital durante el periodo de estudio.

### Seguridad y toxicidad del tratamiento con cCelyvir

El tratamiento fue bien tolerado por todos los perros. Solo uno de ellos mostró efectos adversos tras la primera dosis de cCelyvir y consistió en un edema de la extremidad torácica contralateral al punto de inoculación endovenosa que se resolvió a las 48 horas tras la administración de una dosis única de meloxicam (0.2mg/kg/SC) y difenhidramina (0.5mg/kg/IM). Dos perros mostraron signos de cansancio durante la administración del tratamiento en dos ocasiones cada uno. La mayor parte de los perros sufrieron un deterioro de su estado neurológico (alteración del estado mental, convulsiones y/o alteraciones en el comportamiento) durante el periodo que duró el tratamiento (no durante la administra-

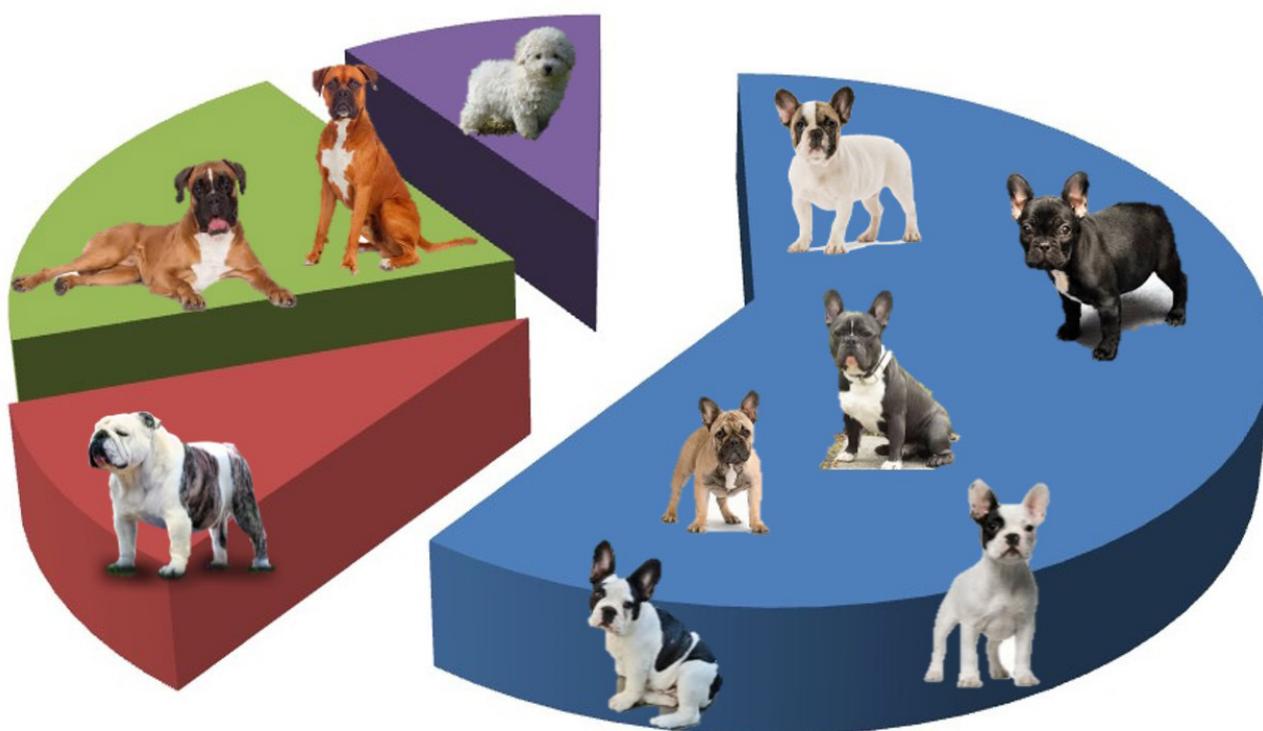


Figura 8. Representación gráfica de la raza de los perros participantes en el estudio.

Paciente	Edad (años)	Raza	Genero	Meses desde la última vacunación	Localización del tumor	Signos clínicos	Tiempo Inicio - Dx (días)	Dosis de cCelyvir recibidas
1	8	Bulldog francés	Macho	8	Temporal	Convulsiones Déficit de reacción de amenaza	28	8
2	6	Bulldog francés	Macho	3	Frontal	Convulsiones	2	11
3	7	Caniche	Macho	1	Temporal Occipital	Convulsiones Marcha compulsiva Hemiparesia Déficit de reacción de amenaza	14	8
4	9	Bulldog inglés	Hembra	11	Temporal Tálamo	Convulsiones	43	1
5	9	Bóxer	Hembra	35	Frontal	Convulsiones Marcha compulsiva Hemiparesia Déficit de reacción de amenaza	230	10
6	9	Bóxer	Macho	5	Frontal	Convulsiones	4	14
7	10	Bulldog francés	Macho	4	Frontal Tálamo	Convulsiones Tetraparesia	61	12
8	6	Bulldog francés	Macho	5	Frontal Parietal Temporal Tálamo	Convulsiones Hemiparesia Déficit de reacción de amenaza	3	5
9	8	Bulldog francés	Hembra	10	Parietal Tálamo	Convulsiones Hemiparesia Déficit de reacción de amenaza	6	17
10	6	Bulldog francés	Macho	3	Frontal	Convulsiones Alteración del estado mental	17	4

**Tabla 3.** Hallazgos clínicos de los pacientes incluidos en el estudio.

ción del mismo) que fueron atribuidas a la evolución propia de su enfermedad y no al tratamiento *per se*.

No se encontraron alteraciones en los hemogramas realizados excepto en el paciente 3 que mostró neutrofilia y leucocitosis monocítica la cual se resolvió durante las primeras tres semanas de tratamiento (Figura 9).

Los niveles de glucosa, urea, creatinina, proteínas totales, albumina, globulinas,  $Ca^{++}$ ,  $Na^{+}$  y  $K^{+}$  se mantuvieron en rangos fisiológicos durante el tratamiento en todos los pacientes, excepto en un perro que manifestó un moderado incremento en la urea que se resolvió rápidamente (Figura 10).

Las alteraciones en los niveles de las enzimas hepáticas se evaluaron para determinar si el tra-

tamiento con cCelyvir podría afectar a la funcionalidad hepática. Los niveles de fosfatasa alcalina estaban por encima del rango fisiológico en 5 perros antes de iniciar el tratamiento y se mantuvieron elevados en tres de ellos hasta su muerte. Durante el tratamiento, todos menos uno de los pacientes, tuvieron una elevación de los niveles de ALP. Solo uno de los pacientes manifestó un incremento concomitante de AST y ALP. Cabe destacar que los mayores incrementos en los niveles de transaminasas se encontraron antes de iniciar el tratamiento con cCelyvir, y fueron atribuidos a la administración de prednisona y/o fenobarbital (Figura 11). Los valores de AST estaban por encima de los valores de referencia en 8 pacientes antes del tratamiento pero se redujeron o mantuvieron estables du-

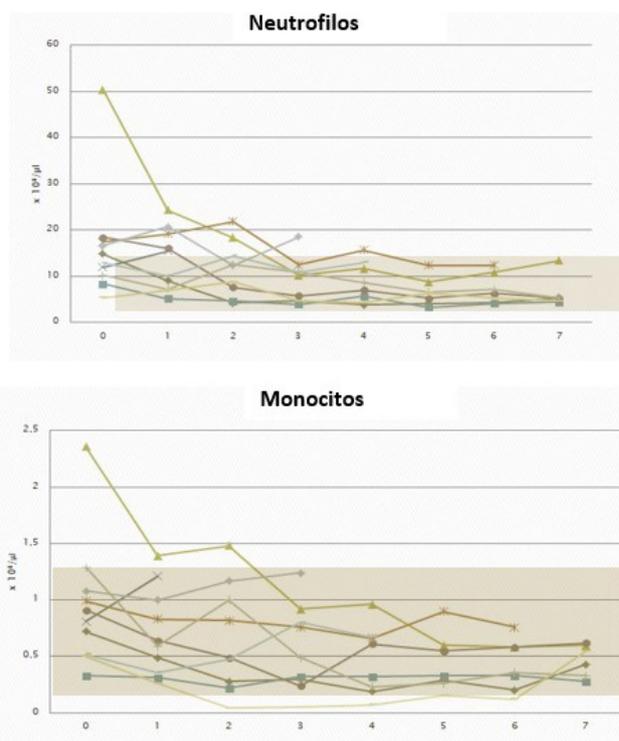
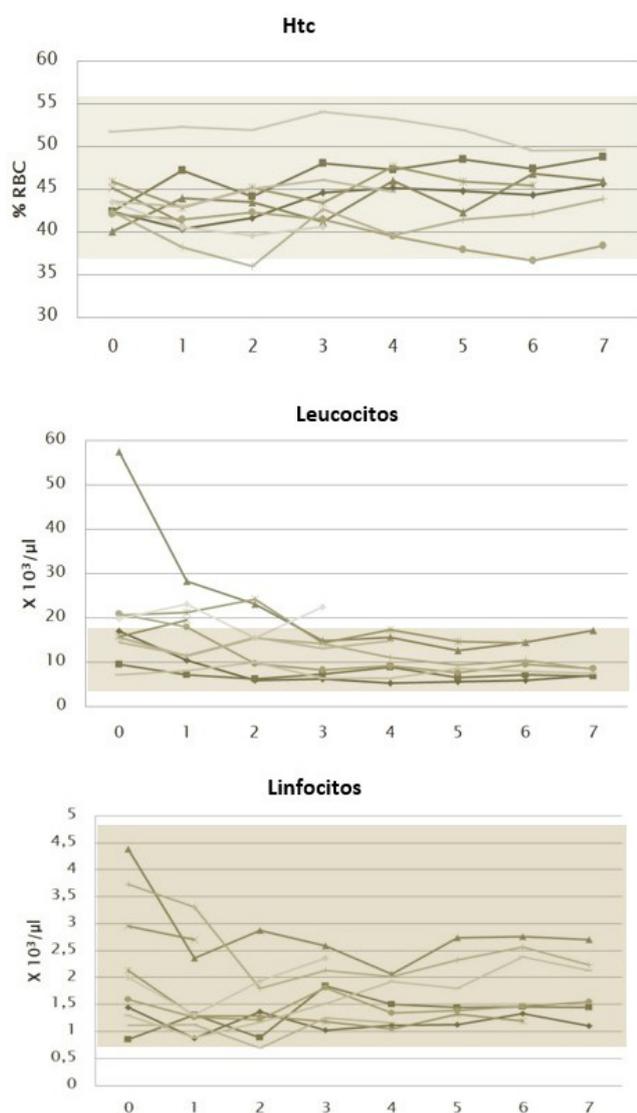
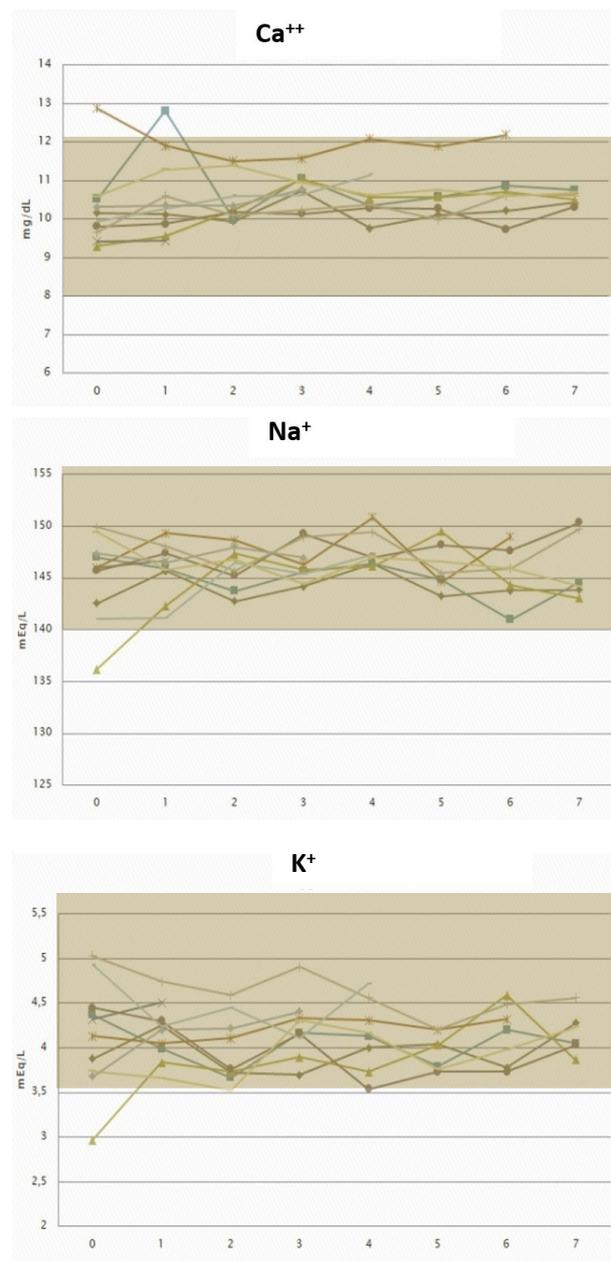
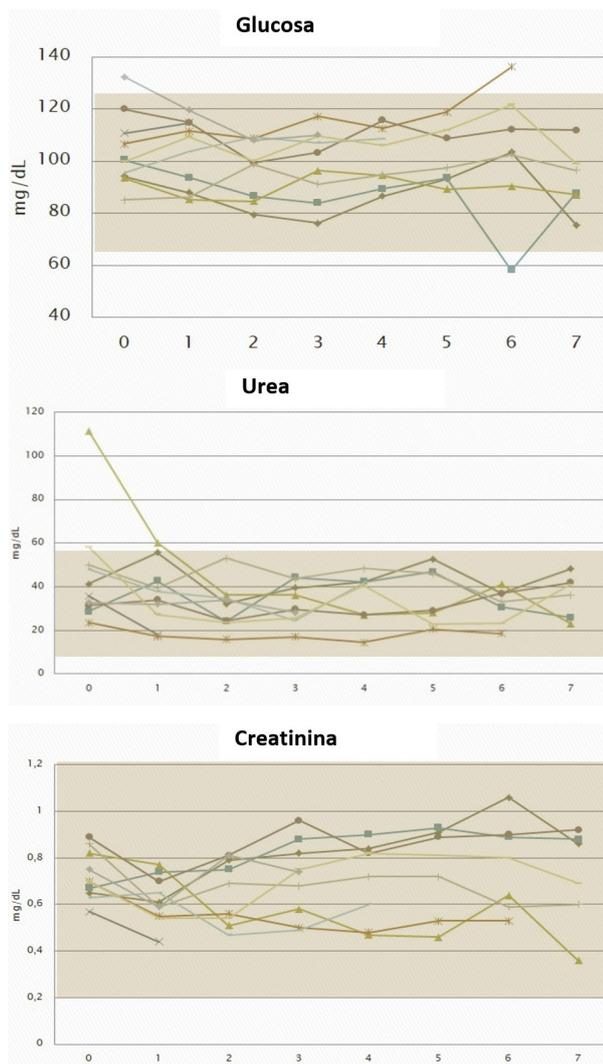


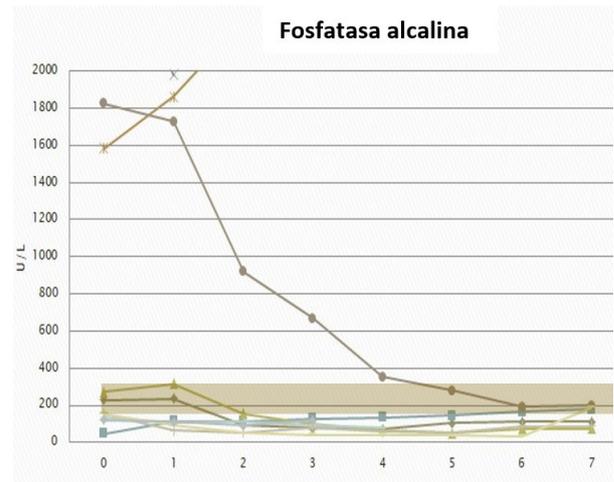
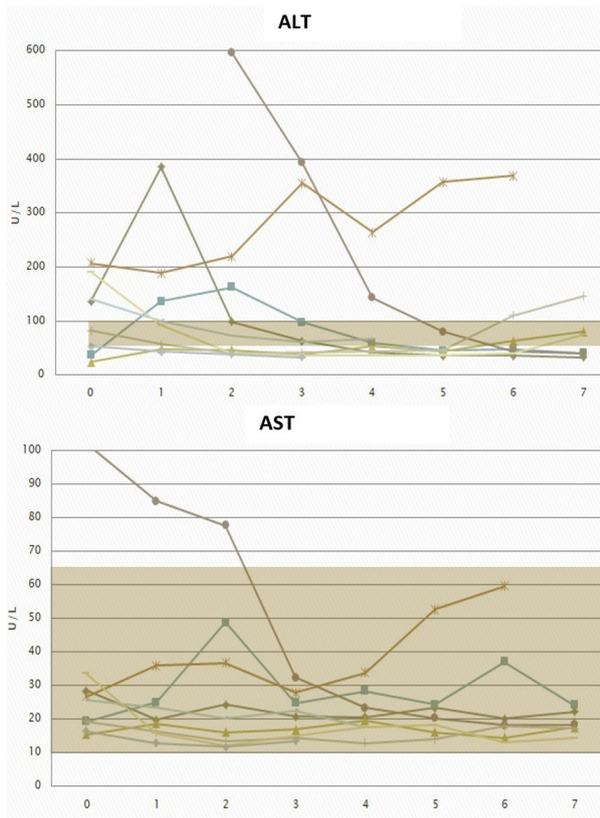
Figura 9. Valores de los diferentes parámetros del hemograma medidos en los 10 perros incluidos en el estudio durante las 8 primeras semanas de tratamiento. El área sombreada se corresponde con los valores de referencia para cada parámetro. Los registros fuera de esta área indican alteraciones en los valores fisiológicos normales, solo encontrados ocasionalmente en el recuento de leucocitos, neutrófilos y monocitos. (Htc; hematocrito).

rante la administración de cCelyvir, excepto en el paciente 5 que mostró un ligero incremento de sus niveles. El paciente 4 sufrió una marcada elevación de enzimas hepáticas atribuida a la administración de corticoides y fenobarbital antes de iniciar el tratamiento con cCelyvir. Los análisis de sangre realizados siete días después de iniciarse el tratamiento en este paciente mostraron bilirrubinemia, hipalbuminemia, anemia

moderada, leucocitosis y elevación de ácidos biliares. Debido al deterioro de los signos clínicos y a las alteraciones hepáticas, el tratamiento fue retirado y el perro eutanasiado por insuficiencia hepática y renal. Los propietarios no permitieron la necropsia de este perro por lo que no se pudo establecer la causa definitiva de su muerte y su relación o no con el tratamiento administrado.



**Figura 10.** Valores obtenidos en los principales parámetros de la bioquímica medidos en los diez perros incluidos en el estudio durante las ocho primeras semanas de tratamiento. El área sombreada se corresponde con los valores de referencia para cada parámetro. Nótese que los valores fuera de este rango fisiológico son ocasionales.



**Figura 11.** Valores de las enzimas hepáticas medidos en los diez perros incluidos en el estudio durante las ocho primeras semanas de tratamiento. El área sombreada se corresponde con los valores de referencia para cada parámetro. Nótese como los valores de ALT se encontraron por encima de los valores fisiológicos en la mayor parte de los pacientes antes de iniciarse el tratamiento con cCelyvir, siendo atribuida esta elevación al tratamiento con corticoides y/o fenobarbital.

### Hallazgos radiológicos

Todos los perros mostraron los signos radiológicos característicos de gliomas rostrotentoriales de alto grado (lesión intraaxial única, con prolongación de los tiempos de relajación en las secuencias principales y grado variable de realce, pero generalmente intenso) en los estudios de RM realizados antes de su inclusión en el estudio. La localización de la lesión fue variable y afectó a uno (5 perros) o múltiples lóbulos craneales y/o el tálamo (5 perros) (Tabla 3). El realce fue intenso y en anillo en 9 perros (Figura 6A) mientras que uno de los perros (paciente 2) no mostró realce significativo (Figura 6C). La mayor parte de los perros mostraron efecto masa con colapso ventricular (8 de 10) y/o desviación de la línea media (9 de 10). Se apreció edema perilesional en 9 de los 10 perros. El área de la lesión varió entre los 57mm<sup>2</sup> y los 670mm<sup>2</sup> (media: 281 mm<sup>2</sup>). Un detalle de las características radiológicas de los tumores puede verse resumido en la tabla 4.

El paciente 3, con un glioma en lóbulo temporal derecho, fue evaluado mediante TC inmediatamente tras la eutanasia para investigar la causa del dolor de mandíbula que comenzó a manifestar varias semanas antes y que no pudo atribuirse a la presencia del glioma y/o a efectos secundarios de la medicación. En este paciente las imágenes de la TC mostraron la existencia del glioma en la ubicación esperada acompañado de una resorción ósea bilateral que afectaba a la superficie orbitaria de ambos huesos frontales (Figura 12I), el ala del preesfenoides y basiesfenoides (Figura 12F) y el aspecto ventral del hueso temporal (Figura 12C). La resorción era más severa ipsilateral al tumor. El diagnóstico inicial de este paciente se realizó mediante TC (Figura 12A) y posteriormente se le realizó una RM como parte del protocolo necesario para poder ser incluido en el estudio. En este TC inicial previo al tratamiento no había signos de lesiones óseas del cráneo (Figuras 12B, 12E y 12H). Una evaluación *a posteriori* de la RM de seguimiento obtenida dos meses después de iniciarse el tratamiento con cCelyvir demostró que la resorción ósea ya se había pro-

ducido y que había sido pasada por alto (Figura 12G). Una vez se conoció la posibilidad de que existieran lesiones resortivas óseas (a partir de la eutanasia de este paciente 3) todos los siguientes pacientes (3 perros) incluidos en el estudio fueron evaluados *post mortem* mediante TC, incluso si no mostraron signos que se pudieran relacionar con alteraciones óseas craneales. Dos de ellos (pacientes 5 y 7) mostraron resorción ósea. El paciente 5 mostró una alteración en la lámina interna del hueso frontal inmediatamente sobre el tumor (Figura 12J). El paciente 7 mostró una resorción ósea de la superficie orbital del hueso frontal y el hueso etmoides del lado izquierdo (Figuras 12K y 12L), donde se encontraba el tumor y en ambos huesos parietales.

### Respuesta clínica

Siete pacientes sobrevivieron más de dos meses tras el inicio del tratamiento y tuvieron una revisión de RM. El beneficio clínico de estos siete perros fue evaluado siguiendo los criterios RAVNO: dos perros se clasificaron como enfermedad progresiva, tres con enfermedad estable y dos con respuesta parcial (Figura 13).

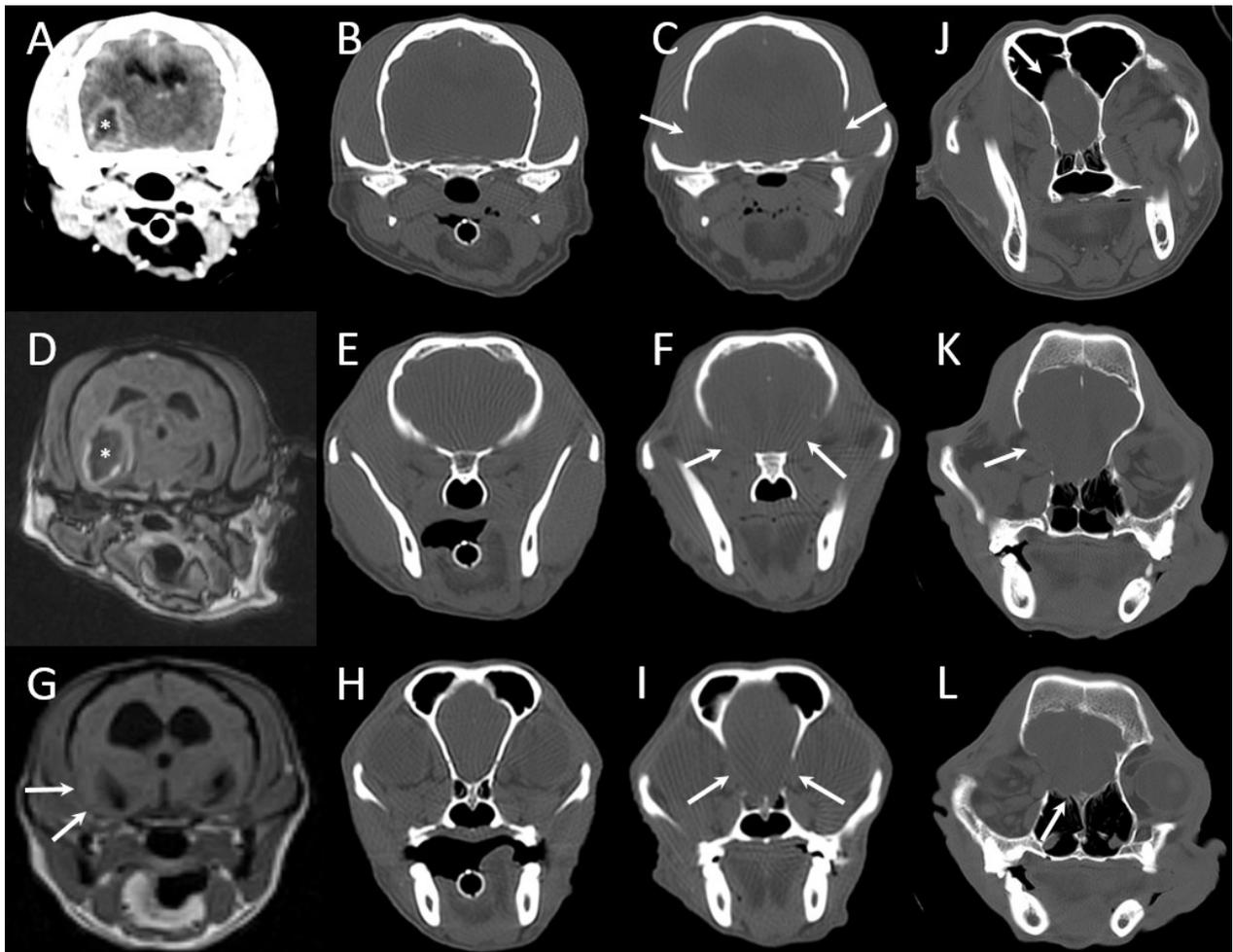
Se apreció una reducción en el tamaño del tumor y de la desviación de la línea media en 57% (4 de 7) y 43% (3 de 7) de los perros respectiva-

mente. Los casos con respuesta parcial tuvieron una reducción del volumen tumoral del 76% y 86% (Figura 14, Tabla 4).

El perro con una mayor reducción de volumen tumoral tuvo una segunda revisión mediante RM a los 4 meses de iniciado el tratamiento que reveló un incremento del tamaño tumoral en un 428%. Las características básicas de la lesión (tipo de realce, edema tumoral y efecto masa) no se vieron significativamente afectadas en la RM de revisión realizada dos meses después de iniciarse el tratamiento excepto en un paciente en el que el edema peritumoral pasó de ser moderado a no ser detectable y en otro en el que el edema cambió de moderado a severo. Cuatro perros murieron naturalmente y seis fueron eutanasiados a petición del propietario por un deterioro clínico significativo y pérdida de la calidad de vida. El tiempo medio de supervivencia (TMS) fue de 128 días (mediana 156; rango 45 a 358 días) desde el inicio de los signos clínicos; de 123 días (mediana 115; rango 42 – 119 días) desde el diagnóstico y de 90 días (mediana 97; rango 20 – 177 días) desde el principio del tratamiento con cCelyvir (Figura 15, Tabla 5). El número medio de dosis de cCelyvir fue de 8 (rango entre 1 y 17) (Tabla 5).

Paciente	1ª RM		2ª RM		Variación	
	Volumen (mm <sup>2</sup> )	Desviación línea media (mm)	Volumen (mm <sup>2</sup> )	Desviación línea media (mm)	Volumen	Desviación línea media
1	113	2,8	398	4,7	+251%	+65%
2	97	1,8	199	1,9	+105%	+3%
3	339	1,8	48	1,5	-86%	-21%
4	163	1,7				
5	350	3,3	308	2,76	-12%	-16%
6	307	4	229	8,6	-25%	+116%
7	380	5,7	410	5,9	+8%	+3%
8	670	5,6				
9	337	2,8	82	0	-76%	-26%
10	57	0				

**Tabla 4.** Resumen de las características radiológicas de las lesiones encontradas en los diez pacientes incluidos en el estudio incluyendo su área, desviación de línea media y los hallazgos encontrados en los estudios de seguimiento.



**Figura 12.** Resorción ósea en tres perros. Paciente 3 (imágenes A – I). Las imágenes A (ventana de tejido blando) y B, E y H (ventana de hueso) fueron obtenidas mediante TC a diferentes niveles (adhesión intertalámica en A, B y C; canal óptico en E y F y seno esfenoidal en H e I) previamente (B, E y H) y posteriormente (C, F e I) a la administración del tratamiento con cCelyvir. Obsérvese la gran lesión que afecta al lóbulo temporal derecho (asterisco en A y D) y la ausencia de alteraciones óseas en las imágenes B, E y H. Las imágenes C y G se obtuvieron con CT y RM respectivamente dos (G) y tres meses (C, inmediatamente tras la eutanasia) después de la administración del cCelyvir, revelando una resorción ósea de ambos huesos temporales (flechas en C y G). Una resorción ósea similar puede observarse en ambas alas del hueso preesfenoides, basiesfenoides y superficie orbital del hueso frontal (flechas en F e I). A efectos demostrativos se aporta la RM pretratamiento del paciente 3 (imagen D) en la que se aprecia la normalidad de los huesos temporales. La resorción ósea postratamiento también pudo ser observada afectando a la lámina interna del hueso frontal del paciente 5 (flecha en J) y el ala del preesfenoides y etmoides (flechas en K y L respectivamente) del paciente 7.

La curva de Kaplan-Meier demostró una probabilidad de supervivencia del 50% a los 100 días de iniciado el tratamiento en contraposición con los tiempos medios de supervivencia de 60 días descritos en la literatura previa de pacientes con gliomas rostrotentoriales sometidos a tratamiento paliativo con corticoides y fenobarbital<sup>80</sup> (Figura 16).

No se apreció una correlación entre el tiempo de supervivencia (desde el inicio del tratamiento) y el volumen del tumor en el momento del diagnóstico (Figura 17A) o tras 2 meses de tratamiento semanal (Figura 17B). De igual manera, el tiempo de supervivencia no mostró una correlación con el crecimiento del tumor (Figura 17C). Sin embargo, se apreció una correlación positiva ( $r=0.8455$ ) entre el número de dosis de cCelyvir y el tiempo de supervivencia (Figura 17D).

Paciente	Inicio - Dx (días)	TS desde inicio (días)	TS desde TX (días)
1	28	210	168
2	2	128	90
3	14	95	77
4	43	102	20
5	230	358	122
6	4	157	147
7	61	184	112
8	3	45	32
9	6	205	177
10	17	72	26

**Tabla 5.** Tabla que refleja el tiempo desde el inicio de los síntomas hasta el momento del diagnóstico (inicio - Dx), el tiempo de supervivencia desde el inicio de la sintomatología y desde el inicio del tratamiento en días en los 10 pacientes incluidos en el estudio.

Se realizó un estudio histopatológico completo en 8 perros. En dos perros la necropsia no se realizó ya que murieron en el domicilio de los propietarios y estos no acudieron al hospital con el cadáver para su examen *post mortem*. Estos dos perros no fueron considerados en la interpretación de las alteraciones histopatológicas. El diagnóstico histopatológico fue de gliomas de alto grado en todos los casos examinados *post mortem*. Seis casos fueron oligodendrogliomas grado III (oligodendrogliomas anaplásicos) y dos de ellos fueron clasificados como como GBM (Figura 13).

### Detección del virus oncolítico e inmunidad antiviral

El adenovirus oncolítico ICOCAV-17 se detectó en la sangre de todos los perros tratados en los que fue analizado (n=9) (Figura 18A). Cinco perros mostraron el mayor número de partículas virales dos días después de la inoculación inicial de cCelyvir, con una reducción progresiva de sus niveles durante los siguientes 14 días post-tratamiento. Dos perros alcanzaron los niveles más altos el tercer día después de la primera administración de cCelyvir, con una reducción progresiva de sus niveles posteriormente. El paciente 5, sin embargo, mostró la titulación viral más alta a los 7 días de la segunda dosis de cCelyvir (día 14 de tratamiento). En este pa-

ciente es en el que había transcurrido más tiempo desde la última vacunación frente a adenovirus canino hasta el inicio del tratamiento (35 meses). A pesar de ello, en este perro se detectó una titulación de anticuerpos anti-CAV-2 en sangre periférica similar a la de otros perros que habían sido vacunados más recientemente. Todos los perros tenían anticuerpos neutralizantes anti-CAV-2 antes del tratamiento, mostrando un aumento gradual de sus niveles tras la primera dosis de cCelyvir y una estabilización a partir de la segunda dosis (Figura 18B). Aunque todos los perros tuvieron una titulación de anticuerpos anti-CAV-2 similar mostraron grandes diferencias en los genomas virales detectados en sangre, existiendo una correlación negativa ( $r=0.40506$ ) entre ambas mediciones (Figura 18C).

Los estudios inmunohistoquímicos permitieron detectar células positivas a adenovirus caninos (ICOCAV-17) en el interior de los gliomas de los tres perros en los que se evaluó (pacientes 1, 6 y 10) (Figura 19).

### Respuesta inmunitaria en sangre periférica

Puesto que las citoquinas involucradas en el control de la respuesta inmunitaria, tanto innata como adaptativa, juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad tumoral e inflamatoria, se

realizó una cuantificación de citoquinas en sangre periférica durante las 4 primeras semanas de tratamiento para determinar si la administración de cCelyvir modificaba su secreción. No se encontraron alteraciones en los niveles de IL-2, IL-6, IL-7, IL-15, IL-18, GM-CSF, CCL2 o CXCL10 durante el tratamiento (Figura 20). Un perro (paciente 7) mostró un incremento en los niveles de IL-2, IL-6, IL-7, IL-15, IL-18, GM-CSF y CXCL10 tras la cuarta dosis de cCelyvir. El paciente 2 tuvo los niveles de IL-2 aumentados antes y durante el tratamiento. Los niveles de IL-8, IL-10, KC-like y IFN- $\gamma$  tuvieron algunas variaciones poco significativas en ciertos pacientes.

También se cuantificaron las poblaciones celulares inmunitarias en sangre periférica, sin encontrarse diferencias significativas en niveles de neutrófilos, linfocitos T, macrófagos o células NK (*natural killer*).

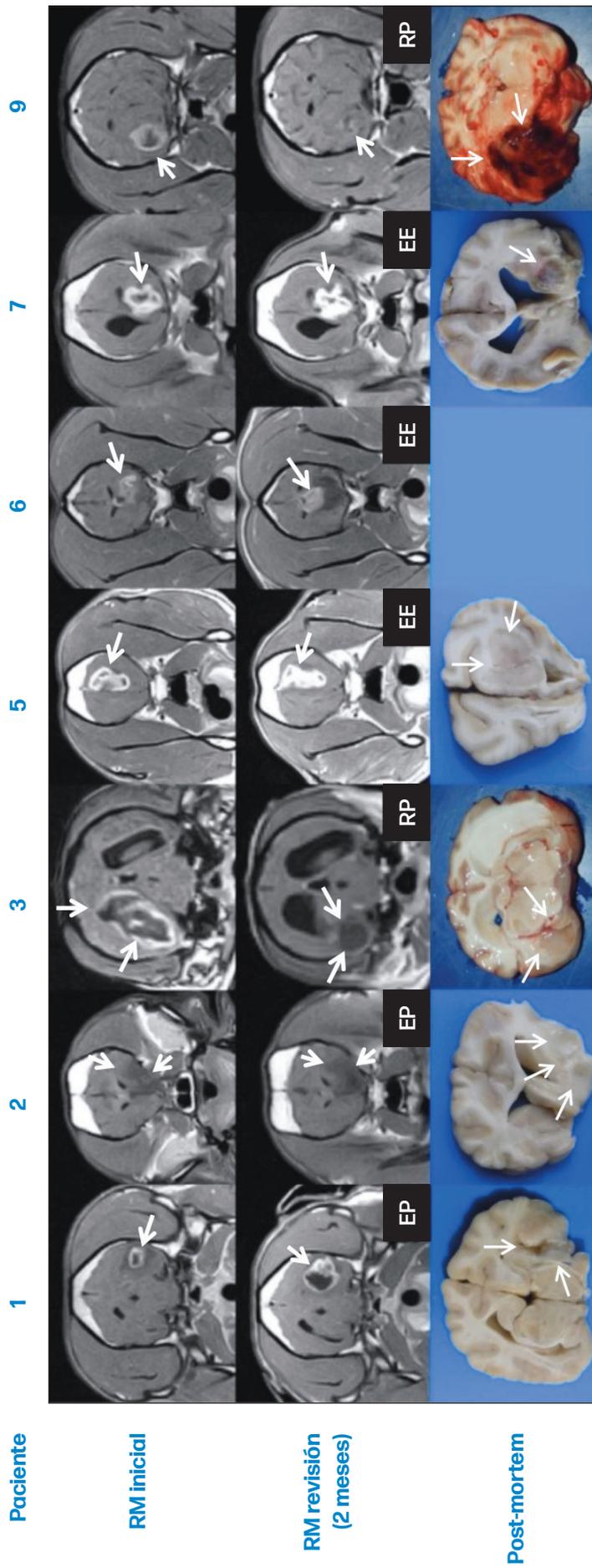
### Infiltrado tumoral por sistema inmunitario

Se realizó un estudio histológico para determinar si el tratamiento con cCelyvir produjo cambios en la población de TILs. Estos TILs no fueron detectados en dos casos con oligodendrogliomas grado III. En el resto de los pacientes se encontraron infiltrados linfocíticos formando manguitos perivasculares alrededor de vasos glomeruloides neoformados del tumor, así como de manera dispersa en el interior del mismo (Figura 21).

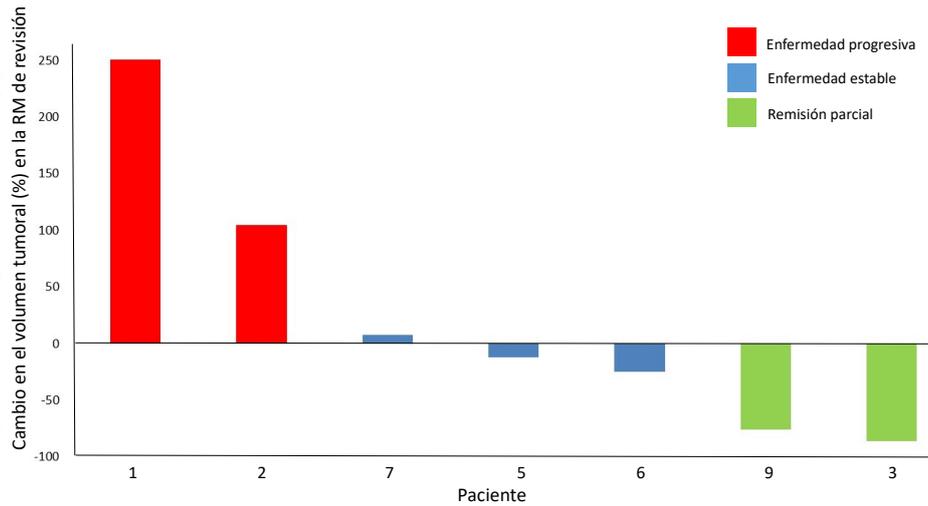
Para determinar con más exactitud estos hallazgos se realizó un estudio inmunohistoquímico de los tumores (Tabla 6). La población linfocítica más prominente fueron TILs CD3<sup>+</sup> en todos los casos (media de 36 células/mm<sup>2</sup>) pero de manera particularmente relevante en los GBMs (118.2 células/mm<sup>2</sup>) comparados con los encontrados en los oligodendrogliomas grado III (8.6 células/mm<sup>2</sup>). Los linfocitos FOXP3<sup>+</sup>, indicativos de Tregs, se detectaron en solo dos de las

muestras evaluadas (25%) de manera más relevante en el GBM. Una pequeña cantidad de linfocitos CD20<sup>+</sup> se encontraron en todos los casos (media de 4.6 células/mm<sup>2</sup>). El paciente 6 mostró el número más alto en todas las poblaciones celulares (Figura 22, Tabla 6). No se encontró una relación entre el grado histopatológico o el tipo o grado de infiltración inflamatoria y el tiempo de supervivencia desde el inicio de los signos clínicos (151 días en oligodendrogliomas grado III vs. 170 días en GBM). Tampoco se encontraron diferencias entre el grado y tipo de infiltrado inflamatorio de los casos de estudio con la población de referencia de pacientes no tratados obtenida del banco de tejidos, y que ha sido referenciada previamente por el grupo de estudio de la UPMiC de la Universidad Autónoma de Barcelona<sup>106</sup>.

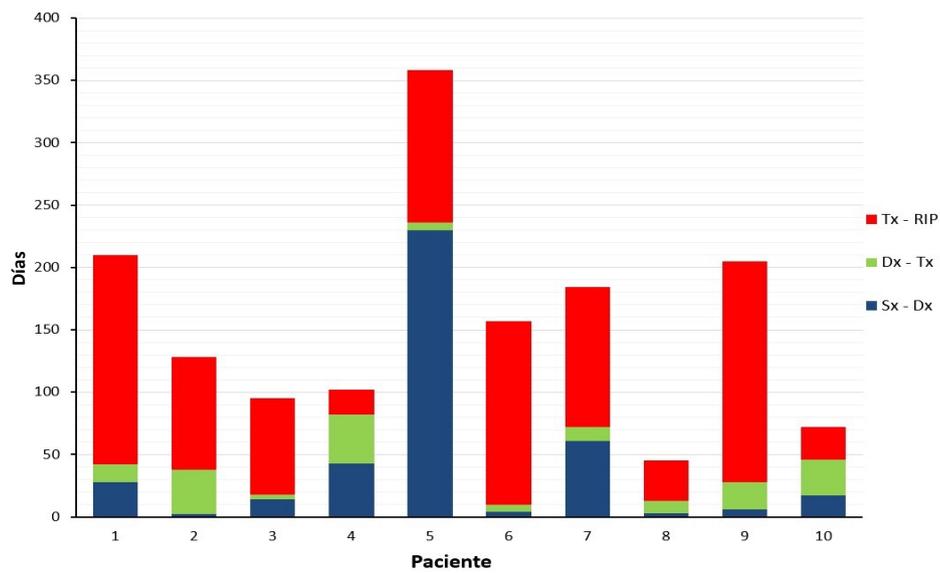
Para confirmar cómo el microambiente inmune intratumoral podría verse afectado por el tratamiento con cCelyvir se empleó un algoritmo CIBERSORT para analizar los resultados de expresión génica masiva de estos tumores. Con este tipo de algoritmos se puede estimar la composición de TILs a partir de la expresión de ARN en bruto (Figura 23). Los pacientes con enfermedad estable (2 de 5 analizados) y respuesta parcial (1 de 5 analizados) tuvieron una tendencia a una infiltración menor de linfocitos B de memoria y una activación mayor de linfocitos B. De igual manera, se apreció una tendencia a una mayor infiltración de monocitos / macrófagos en pacientes con enfermedad estable y respuesta parcial. Los perros con lesiones osteolíticas (3 de 4 analizados) también mostraron cambios en la composición de TILs, con una reducción en la población de células B de memoria y una infiltración mayor de las líneas celulares monocito / macrófago.



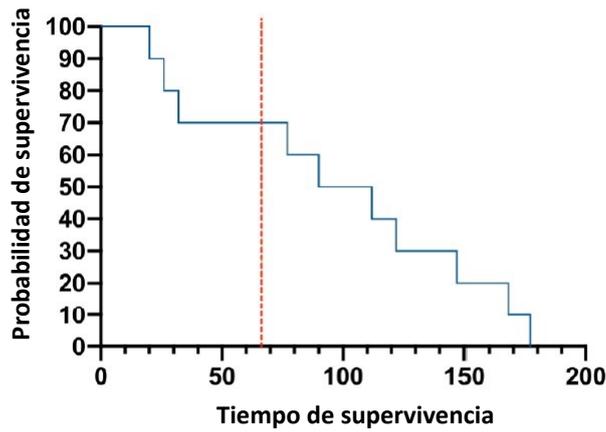
**Figura 13.** Seguimiento radiológico y anatomopatológico de los 7 perros a los que se les realizó RM de revisión a los 2 meses. La respuesta al tratamiento de acuerdo a los criterios RAVNO se ha descrito en la fila del medio. Las imágenes inferiores muestran los hallazgos macroscópicos de las lesiones salvo en el caso 6 en el que los propietarios no permitieron la necropsia. EP: enfermedad progresiva; RP: respuesta parcial y EE: enfermedad estable.



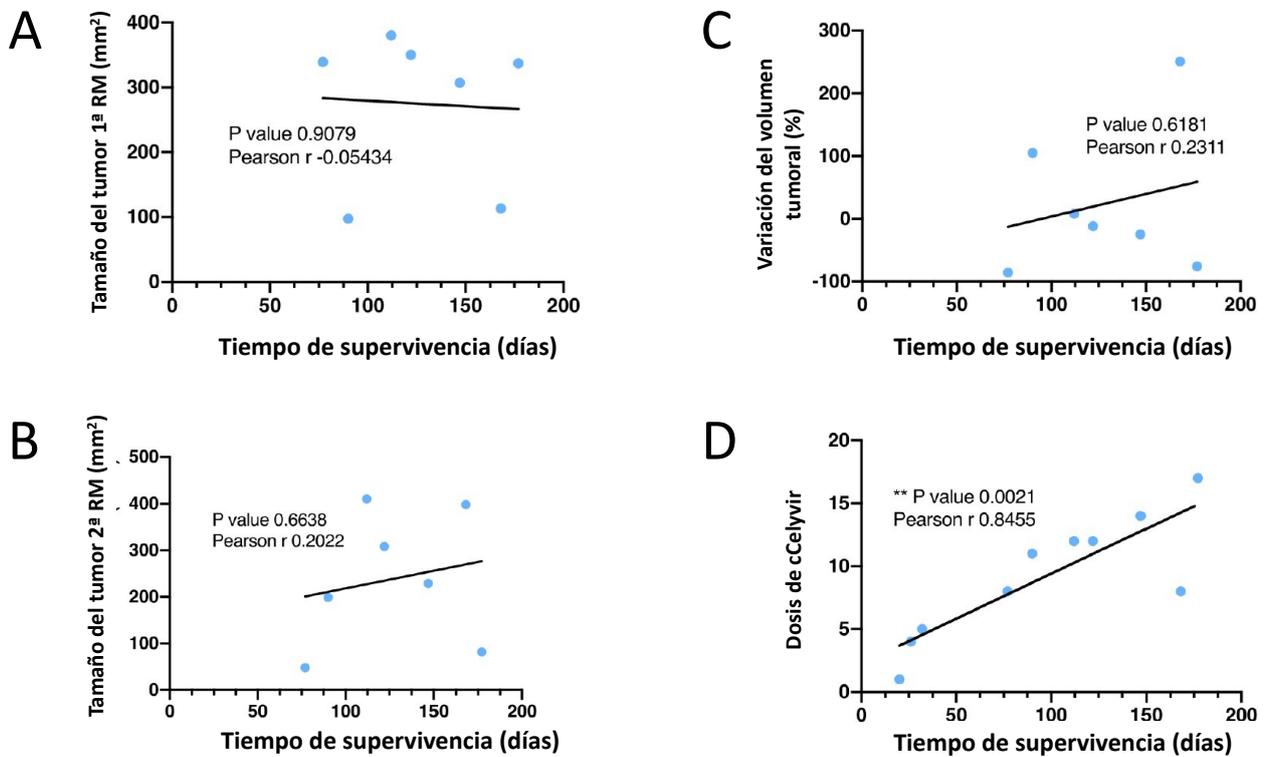
**Figura 14.** Diagrama de cascada que muestra los cambios en el tamaño del tumor entre el diagnóstico y los dos meses tras iniciar tratamiento con cCelyvir en los siete perros que tuvieron RM de revisión.



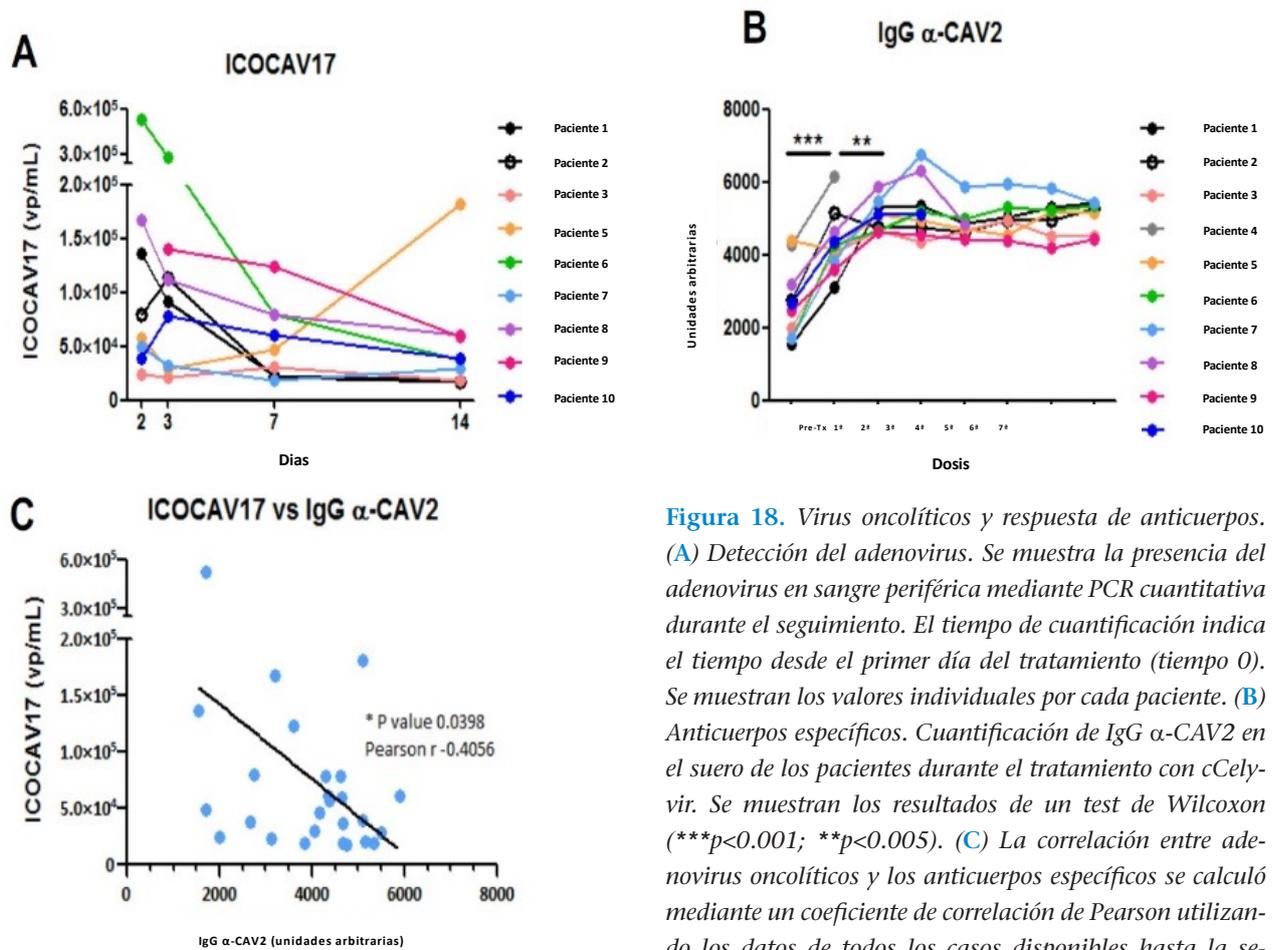
**Figura 15.** Diagrama de barras de los tiempos de supervivencia de los 10 pacientes incluidos en el estudio desde el inicio de los signos clínicos. Las columnas quedan fraccionadas en tiempo desde el inicio de los síntomas hasta el diagnóstico (Sx - Dx), desde el diagnóstico hasta el tratamiento (Dx - TX) y desde el inicio del tratamiento hasta la muerte del perro (Tx - RIP).



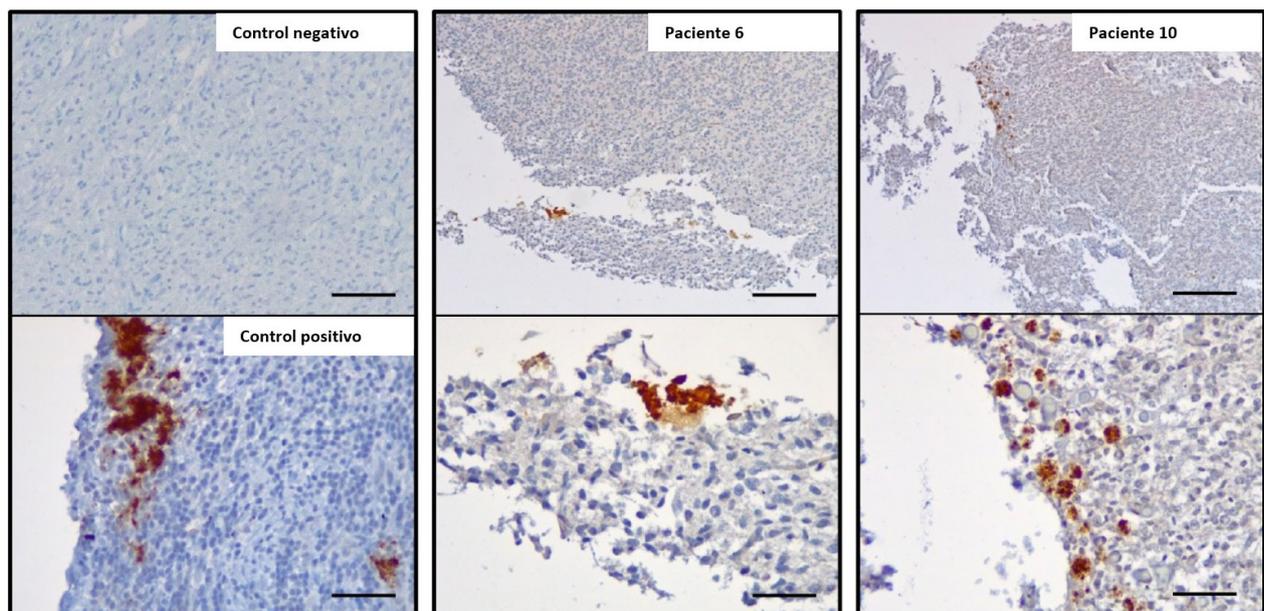
**Figura 16.** Curva de Kaplan-Meier que muestra las probabilidades de supervivencia en perros tratados con cCelyvir (línea azul) comenzando desde el día del tratamiento hasta su muerte. La línea roja discontinua representa el tiempo de supervivencia media de perros con gliomas con tratamiento paliativo según la literatura.



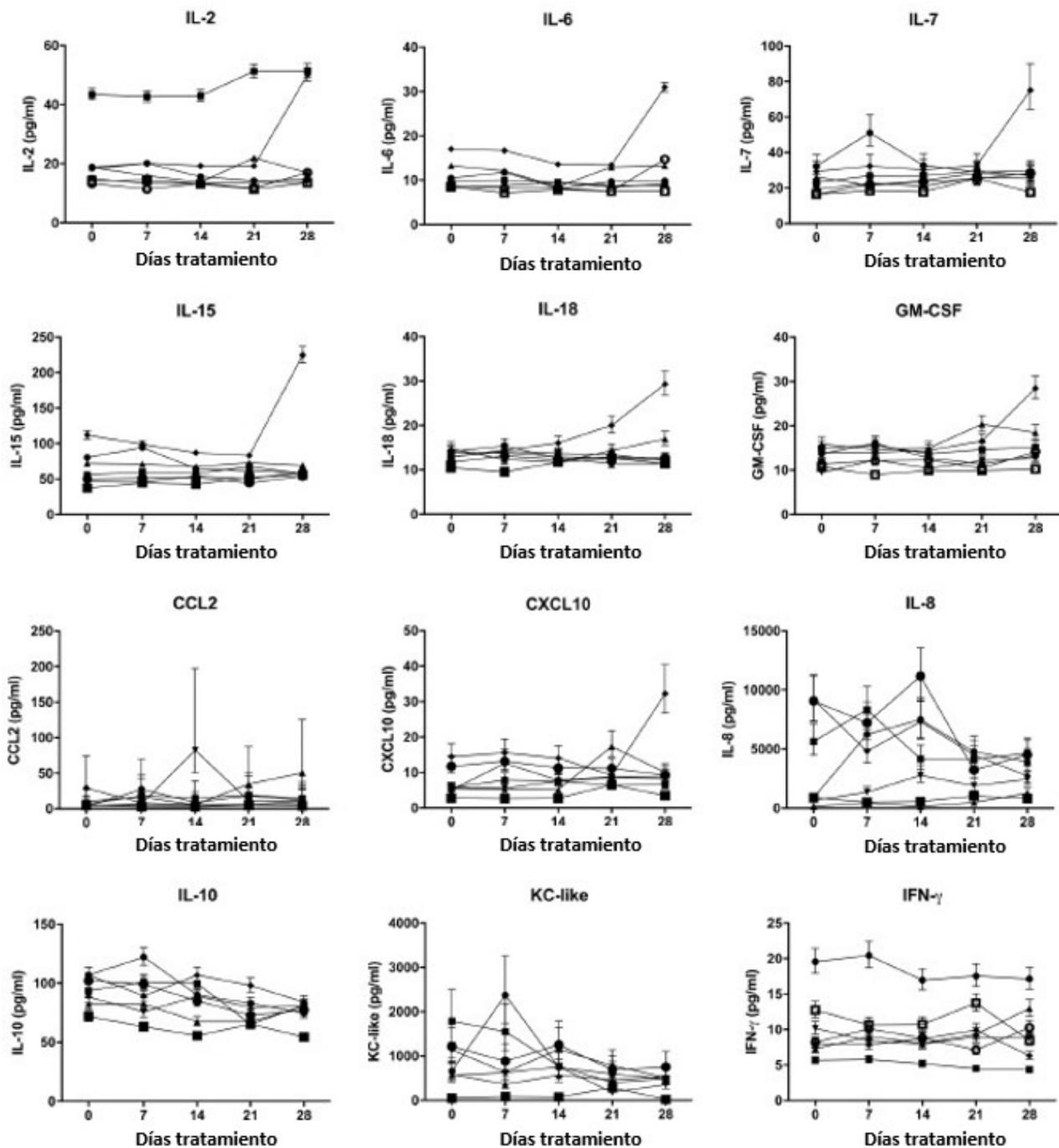
**Figura 17.** Análisis de correlación entre el tiempo de supervivencia y el tamaño del tumor en el momento del diagnóstico (primera RM, **A**), segunda RM (**B**) variación del volumen tumoral (**C**) y dosis de cCelyvir (**D**) calculados con el coeficiente de correlación de Pearson. Los puntos azules se corresponden con los valores individuales. En cada gráfica se muestran las líneas de regresión y los valores de r.



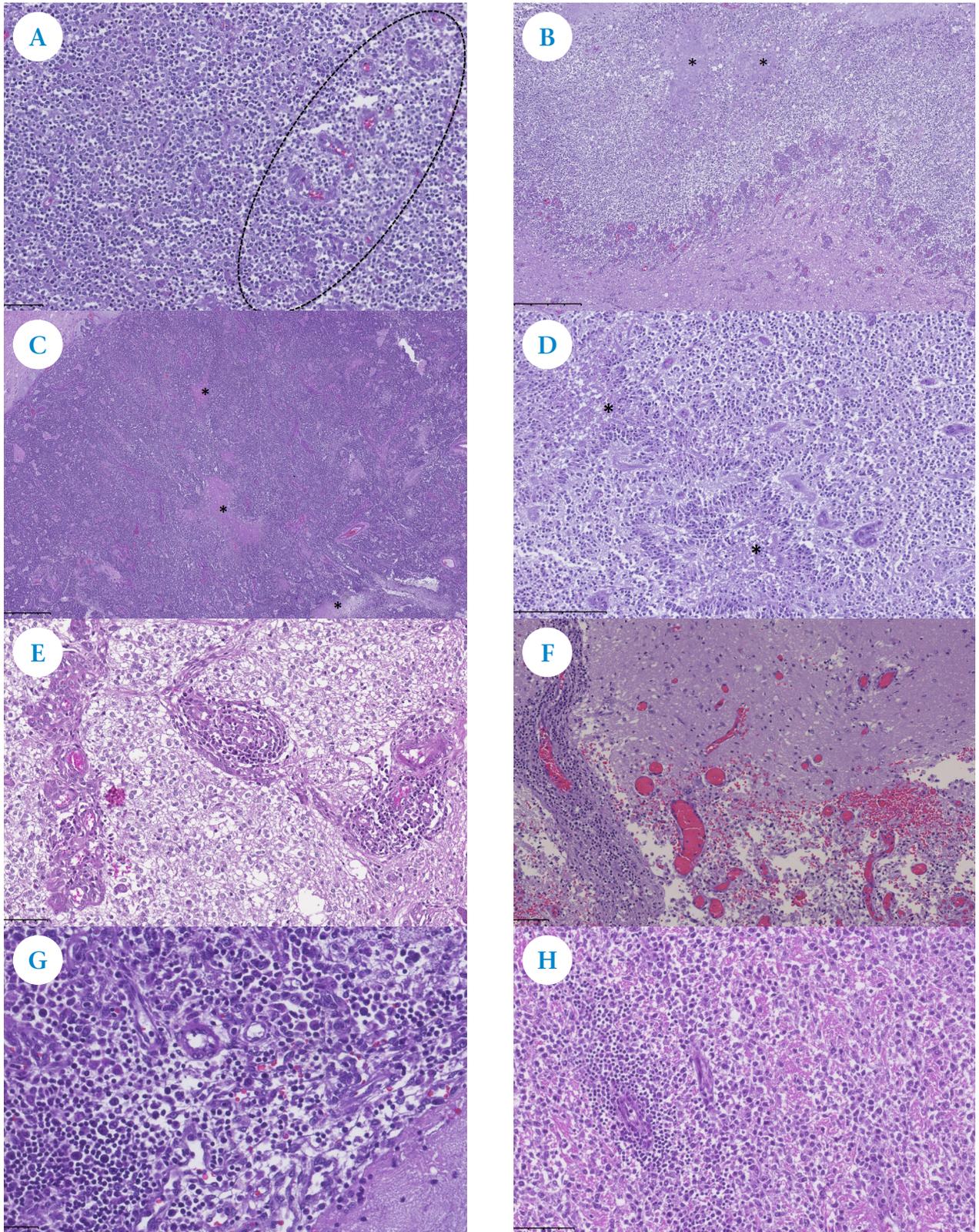
**Figura 18.** Virus oncolíticos y respuesta de anticuerpos. (A) Detección del adenovirus. Se muestra la presencia del adenovirus en sangre periférica mediante PCR cuantitativa durante el seguimiento. El tiempo de cuantificación indica el tiempo desde el primer día del tratamiento (tiempo 0). Se muestran los valores individuales por cada paciente. (B) Anticuerpos específicos. Cuantificación de IgG  $\alpha$ -CAV2 en el suero de los pacientes durante el tratamiento con cCelyvir. Se muestran los resultados de un test de Wilcoxon (\*\* $p < 0.001$ ; \* $p < 0.005$ ). (C) La correlación entre adenovirus oncolíticos y los anticuerpos específicos se calculó mediante un coeficiente de correlación de Pearson utilizando los datos de todos los casos disponibles hasta la segunda semana de tratamiento (14 días desde el inicio del tratamiento). Se muestran los valores individuales (puntos azules) y la línea de regresión. \* $p < 0.05$ .



**Figura 19.** Detección de adenovirus en gliomas mediante inmunohistoquímica. Imágenes representativas que muestran las células positivas a ICOCV-17 (marrón) en tejido control y necropsias de los pacientes 6 y 10. Escala: 50 $\mu$ m (controles negativo y positivo), 200 $\mu$ m (imágenes de arriba de pacientes 6 y 10) y 50 $\mu$ m (imágenes de abajo de pacientes 6 y 10).



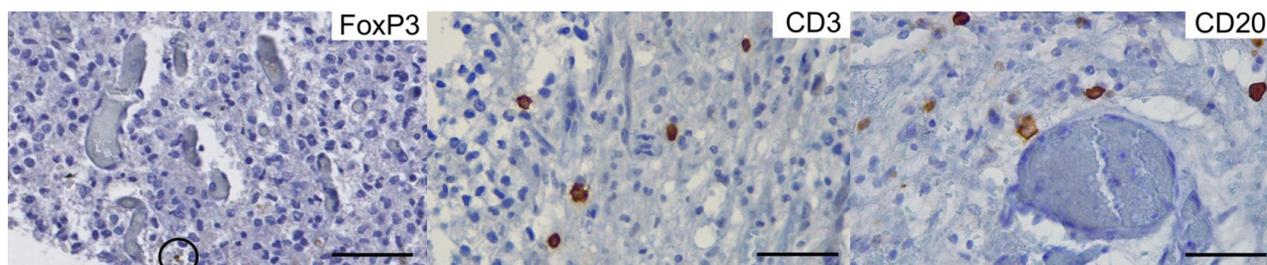
**Figura 20.** Citoquinas en sangre periférica de los perros tratados cuantificadas mediante ensayo multiplex. El suero de los perros fue analizado antes del inicio del tratamiento (día 0) y semanalmente después de los primeros cuatro tratamientos (días 7, 14, 21 y 28) para cuantificar IL-2, IL-6, IL-7, IL-15, IL-18, GM-CSF, CCL2, CXCL10, IL8, IL-10, KC-like y IFN- $\gamma$ . Se muestran los valores individuales.



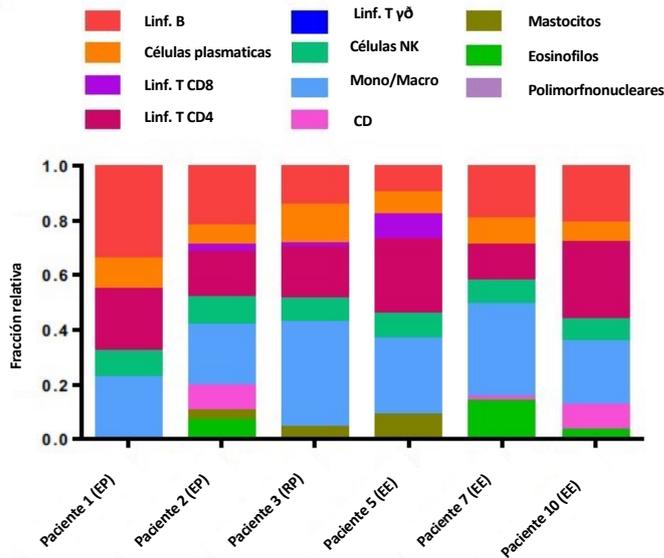
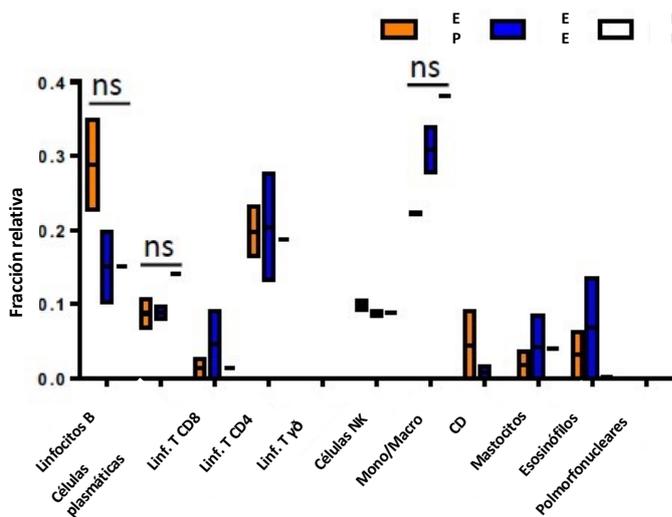
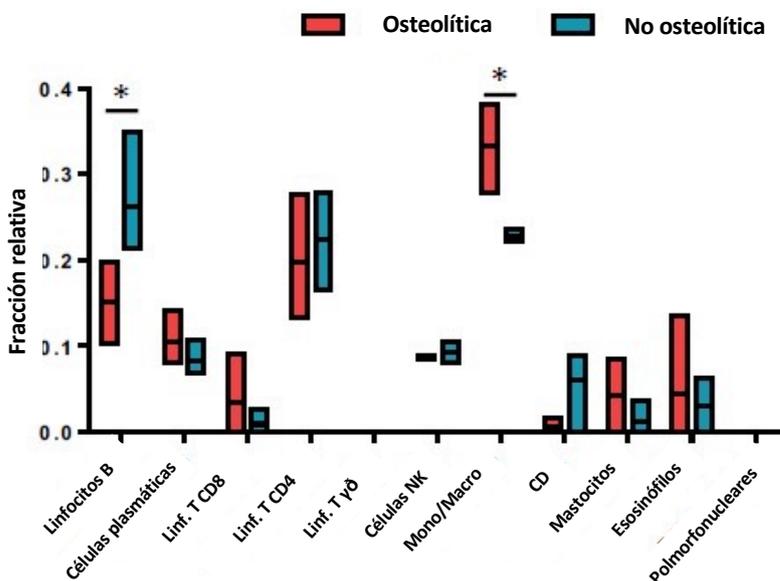
**Figura 21.** Imágenes representativas de gliomas de alto grado en perros tratados con cCelyvir. Tinción de hematoxilina / eosina. Las imágenes (A) y (B) muestran una proliferación vascular glomeruloide (circundado en A) en un oligodendroglioma grado III con áreas de secreción mucosa (asteriscos en B). Se aprecia una alta densidad celular con áreas necróticas en GBM (asteriscos en imágenes C y D). Obsérvese el crecimiento en empalizada rodeando las áreas necróticas en D. Las imágenes E y F muestran un infiltrado inflamatorio mononuclear perivascular alrededor de los glomeruloides con hemorragias peritumorales. Un patrón linfohistiocítico puede observarse en el GBM mostrado en G. En ciertos casos se apreció un infiltrado linfoide intratumoral (H).

Paciente	Características del tumor					
	Localización (lóbulo/s y/o tálamo)	Tipo	Patrón inflamatorio	Media FOXP3 <sup>+</sup> TILs / mm <sup>2</sup>	Media CD3 <sup>+</sup> TILs / mm <sup>2</sup>	Media CD20 <sup>+</sup> TILs / mm <sup>2</sup>
1	Temporal	Olig. grado III	Ninguno	0	0	0
2	Frontal	Olig. grado III	Ninguno	0	0	0
3	Temporal Occipital	Olig. grado III	Perivascular Intratumoral	0	28	2.4
4	Temporal Tálamo	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
5	Frontal	Olig. grado III	Perivascular Intratumoral	0	4.8	1.6
6	Frontal	GBM	Perivascular Intratumoral	17.6	226	27.2
7	Frontal Tálamo	GBM	Perivascular Intratumoral	0	10.4	1.6
8	Frontal Parietal Temporal Tálamo	Olig. grado III	Perivascular	0	12.8	0.8
9	Parietal Tálamo	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
10	Frontal	Olig. grado III	Intratumoral	1.6	6.4	3.2
<b>Media</b>				<b>2.4</b>	<b>36</b>	<b>4.6</b>

**Tabla 6.** Hallazgos inmunohistopatológicos de los casos tratados mediante cCelyvir. Se describe la localización, tipo de tumor, patrón inflamatorio y media de TILs por mm<sup>2</sup> de cada tipo celular evaluado (FOXP3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> y CD20<sup>+</sup>). TILs (tumor infiltration lymphocytes).



**Figura 22.** Estudio inmunohistoquímico demostrando la presencia de población inmune en el interior de los gliomas en perros tratados con cCelyvir. Escala: 50µm.

**A****B****C**

**Figura 23.** Caracterización del microambiente inmune intratumoral tras el tratamiento con cCelyvir. **(A)** Abundancia relativa de 11 tipos de TILs en 6 perros estimados con CIBERSORT. **(B)** Fracción relativa de células inmunes de los pacientes estratificados en función del beneficio clínico obtenido tras el tratamiento con cCelyvir. **(C)** Fracción relativa de células inmunes comparando aquellos pacientes que tuvieron lesiones osteolíticas en los estudios de TC de los que no tuvieron lesiones osteolíticas. Test estadístico: ANOVA de dos vías y test comparativo múltiple de Bonferroni; Alpha: 0.05; ns: no significativo; \* $p < 0.05$ . CD: células dendríticas; Mono/Macro: Monocitos / Macrófagos; EP: Enfermedad progresiva; EE: Enfermedad estable; RP: Respuesta parcial.

## Discusión

### Reseña y semiología clínica de los pacientes

Diez perros cumplieron los criterios de inclusión para el estudio, nueve de los cuales pertenecían a razas braquicefálicas: bulldog francés, bulldog inglés y bóxer. Aunque no se ha comparado el perfil de los pacientes incluidos en el estudio con la incidencia de los gliomas en la población general, estos números ya indican la fuerte predisposición racial que las razas braquicéfalas padecen por los gliomas, tal y como se ha descrito en artículos previos<sup>79,107</sup>. Esta predilección por la raza sugiere que la aparición de gliomas podría tener un cierto condicionante genético. En humanos, a pesar de que es infrecuente que los gliomas conformen un síndrome tumoral hereditario, pueden aparecer gliomas en grupos familiares<sup>108</sup>. Tanto en humanos como en animales la mayor incidencia de gliomas en algunas familias podría indicar una predisposición genética pero también una exposición ambiental común. En el estudio presentado no se encontraron relaciones familiares entre los perros de los diferentes grupos raciales. La predominancia de machos frente a hembras (70%) y la edad de presentación de los síntomas (8 años) también es un hallazgo que concuerda con los datos descritos en la literatura (56% y 7.9 años respectivamente)<sup>79</sup>. Por estos motivos, la población de perros incluidos en este estudio puede ser considerada una muestra representativa de los gliomas de alto grado en perros.

Dado que uno de los criterios de inclusión en el estudio fue la ubicación por posición rostral del tumor, era esperable que el signo clínico más frecuente fuesen las convulsiones, dado que es la consecuencia más habitual de una lesión prosencefálica. El tiempo medio transcurrido entre el inicio de los signos clínicos y el diagnóstico fue de 40 días, algo mayor de lo que está descrito en perros con astrocitomas (21 días) u oligodendrogliomas (14 días), lo que podría indicar la menor disponibilidad en España de técnicas avanzadas de diagnóstico por

imagen (RM fundamentalmente) necesarias para el diagnóstico *pre mortem* en comparación con otros países<sup>109</sup>. Por otro lado, las características radiológicas de las lesiones intracraneales se corresponden perfectamente con los hallazgos clásicos de los gliomas en perros<sup>89,90</sup>. Hallazgos que, si bien no son patognomónicos, son altamente específicos. Aunque en medicina humana se requiere de un diagnóstico definitivo mediante el estudio histopatológico de las lesiones (obtenido mediante biopsia cerebral generalmente estereotáctica) previo a la instauración del tratamiento específico (quirúrgico, radioterapéutico o quimioterapéutico)<sup>4</sup> la limitada accesibilidad a las técnicas de biopsia estereotáctica y la escasa experiencia en la interpretación de biopsias de lesiones cerebrales hacen que en medicina veterinaria el escenario sea bien diferente, basándose el tratamiento en un diagnóstico presuntivo gracias a los hallazgos de las pruebas de imagen y la reseña del paciente<sup>110</sup>. A pesar de estas limitaciones, todos los perros incluidos en el estudio padecían realmente un glioma de alto grado tal y como se confirmó en los estudios histopatológicos *post mortem*.

### Seguridad del tratamiento con cCelyvir

#### Efectos sistémicos

El tratamiento con cCelyvir fue bien tolerado, tal y como ya había sido descrito en estudios en perros con tumores sólidos extracraneales<sup>94</sup>. En nuestro estudio únicamente se detectaron efectos adversos leves como edema de extremidades y/o cansancio de curso autolimitante que requirieron un tratamiento con antiinflamatorios durante un corto periodo de tiempo. Otros autores habían descrito que la inyección intratumoral de ICOCAV-17 puede producir efectos adversos leves debido al efecto lítico del virus en el punto de inoculación, lo cual podría llegar a ser doloroso y dar lugar a tiempos de sangrado prolongados seguidos de coagulación intravascular diseminada, aunque no se relacionó con toxicidad hepática ni con alteraciones bioquímicas<sup>43</sup>. En este

sentido, en nuestro estudio no se encontraron alteraciones significativas ni en el hemograma ni en los parámetros bioquímicos en la mayor parte de los pacientes tratados. Solo un paciente tuvo que ser eutanasiado 21 días después de iniciarse el tratamiento con cCelyvir debido a una disfunción hepática grave. No obstante, este paciente ya tenía los niveles de enzimas hepáticas elevados antes de iniciar el tratamiento, siendo posible que padeciese una enfermedad hepática preexistente que no fue detectada (hepatopatía tóxica debido a la administración de fenobarbital y/o corticoides, hepatitis infecciosa o neoplasia hepática difusa) agravada o coincidente con la administración de cCelyvir.

El ICOCAV-17 se construyó a partir de la forma salvaje del adenovirus canino CAV-2, muy cercanamente relacionado con el CAV-1, siendo este último un virus que genera una hepatitis altamente infecciosa en perros<sup>74</sup>. Por otro lado, se ha descrito que los CRADs caninos se acumulan rápidamente en el hígado debido a su gran hepatotropismo<sup>111</sup>, y su vehiculización a través de CMMs no impide este acúmulo<sup>112</sup>. A pesar de que se pueden encontrar lesiones microscópicas como consecuencia de una respuesta inflamatoria crónica en diferentes órganos de pacientes tratados con cCelyvir, no se han encontrado cambios patológicos significativos ni signos clínicos relacionados con su administración<sup>94</sup>. Desafortunadamente la causa de la insuficiencia hepática del paciente 4 no pudo ser determinada, ya que los propietarios no consintieron que se realizase la necropsia. No obstante, debido a estas consideraciones, el uso de cCelyvir debe de realizarse con cautela si se sospecha de una enfermedad hepática (ya sea neoplásica o inflamatoria) subyacente.

### Resorción ósea del calvario

La severa resorción ósea encontrada en 3 de los 4 pacientes tratados en los que se examinó minuciosamente la conformación del hueso mediante TC, poco antes o después de su muerte, hacen sospechar de un mecanismo fisiopatológico relacionado con el tratamiento. En medicina huma-

na se escribe ocasionalmente la resorción ósea (o erosión del calvario) asociada a neoplasias cerebrales intraaxiales, particularmente astroblastomas y oligodendrogliomas de bajo grado con curso crónico y, generalmente en huesos cercanos al punto donde se encontraba el tumor<sup>113,114</sup>, una situación que también se ha descrito recientemente en un perro con un oligodendroglioma de alto grado en el lóbulo temporal<sup>115</sup>. Esta resorción ósea se ha descrito más habitualmente asociada a lesiones extra axiales como los meningiomas y tumores de vaina nerviosa de nervios craneales en humanos, perros y gatos<sup>116-118</sup>. Se desconocen con exactitud las causas que producen esta resorción ósea, pero se han propuesto diversos mecanismos como son: a) la invasión directa del hueso por células neoplásicas, b) por fenómenos de hipoperfusión derivada de la presión que ejerce el tumor sobre la tabla interna del hueso afectado o c) que se produzca como consecuencia de la secreción de proteínas proteolíticas (principalmente metaloproteinasas) por parte del tumor<sup>115-116</sup>. Las dos primeras opciones parecen poco factibles dada la existencia de resorciones distantes al punto donde se encontraba el tumor tal y como se evidenció en los pacientes 3 y 7, donde las lesiones eran bilaterales. Por este motivo, se consideró más probable que la erosión del calvario podría estar producida por una proteólisis inducida por el tumor o por la acción directa del propio ICOCAV-17 y/o su vehiculización a través de las CMMS. No obstante, los estudios previos con ICOVIR-17 (el análogo de CRAd específico para humanos) vehiculizados con células progenitoras tienen una mayor diseminación del virus y eficacia terapéutica sin lesiones óseas resortivas asociadas en modelos de xenoinjertos humanos en ratones inmunodeficientes<sup>69</sup>. Cabe destacar que el ICOCAV-17 es un CRAd en el que se ha añadido la secuencia genética que codifica la hialuronidasa, enzima que media la degradación del ácido hialurónico, componente fundamental de la matriz extracelular, y por tanto mejora la distribución del virus sin incrementar su toxicidad tanto *in vitro* como *in vivo* en ratones con xenoinjertos de melanomas<sup>42</sup>. Sin embargo, la degradación de

la matriz extracelular no fue un hallazgo consistente en los estudios histopatológicos realizados en los pacientes tratados con cCelyvir, por lo que el efecto neto de la modificación del ICOCAV-17 en animales con gliomas de alto grado espontáneos sigue siendo desconocido. Estos datos, junto con el hecho de que el ácido hialurónico no es un constituyente del hueso normal, hace pensar que es poco probable que el virus sea el responsable de las lesiones óseas encontradas en nuestros pacientes y que, por lo tanto, debe de existir un mecanismo patogénico relacionado con el propio tumor que hace que aparezca la resorción ósea. Este hecho también ocurre en ciertos meningiomas en humanos, en los que se ha demostrado que la expresión de la metaloproteinasas de matriz tipo 2 por parte de las células tumorales se asocia a una mayor osteolisis aunque no a una mayor patogenicidad<sup>116</sup>. Aunque no se dispone de datos concretos, en opinión de los autores, la resorción ósea en perros con gliomas de larga evolución es más frecuente de lo que se ha descrito hasta el momento, y que el seguimiento sistemático mediante TC de los pacientes con gliomas podría ayudar a establecer la incidencia real de este proceso.

## Efectos del tratamiento con cCelyvir

### *Sobre el sistema inmunitario y la respuesta inflamatoria sistémica*

Todos los perros habían sido vacunados previamente frente a adenovirus caninos, lo que quedó demostrado mediante la identificación de anticuerpos frente al CAV-2 en los análisis realizados antes de iniciar el tratamiento y el rápido aumento de los niveles de IgG- $\alpha$ -CAV-2 tras la primera administración de cCelyvir, llegando a una meseta tras la segunda dosis. La eficacia de estos anticuerpos neutralizantes quedó reflejada por la reducción progresiva de los niveles de adenovirus a partir del tercer día de tratamiento. Estos mismos resultados han sido demostrados en estudios previos y los elevados niveles de anticuerpos no impidieron la obtención de un beneficio clínico tras el tratamiento<sup>94</sup>. En nuestro estudio, esta respuesta del sistema inmunitario tampoco

impidió que se produjese un beneficio clínico; no obstante se encontró una correlación positiva entre los anticuerpos antivirales y las partículas de ICOCAV-17 administradas, lo que sugiere que una concentración menor de anticuerpos podría reducir el número de partículas virales neutralizadas permitiendo una carga mayor de virus oncolíticos en los tumores, mejorando así su eficacia. En este contexto, la utilización de virus oncolíticos generados a partir de virus frente a los que no se vacuna rutinariamente a los perros podría hacer que su eficacia fuese mayor dada la menor inmunidad preexistente una vez se inicia el tratamiento<sup>119</sup>.

Por otro lado, la ausencia de alteraciones significativas en el perfil de citoquinas y poblaciones leucocitarias en la mayor parte de los perros tratados sugiere que el ICOCAV-17 no da lugar a una respuesta inflamatoria sistémica, tal y como se ha demostrado en estudios previos<sup>94</sup>. Esto difiere en gran medida de lo que ocurre cuando se administran otros virus, por ejemplo tras la administración intratecal del virus del Zika que posee potencial efecto oncolítico<sup>19</sup>. En este estudio de Kaid y col. se observó un aumento de los niveles séricos de IL-8, KC-like y CCL2 en los tres perros con diferentes tipos de tumores intracraneales tratados con el virus del Zika. La diferencia en esta respuesta inflamatoria sistémica puede ser debida al propio virus o, más probablemente, a la forma de administración del virus, siendo posible que la vehiculización del ICOCAV-17 a través de las CMMs evitase esta respuesta inflamatoria sistémica. Se ha demostrado que algunos virus modulan las señales expresadas por la célula hospedadora para escapar a la activación de los mecanismos de inmunidad innata y establecer una infección productiva<sup>120</sup>. Esta acción sobre el sistema inmunitario es virus y especie dependiente, habiéndose demostrado, por ejemplo, que el ICOCAV-17 produce una respuesta inmunitaria más limitada (medida en términos de una menor fosforilación de las proteínas AKT y c-JUN, inductoras de la respuesta del sistema inmune) en las CMM caninas que infecta de la que produce el ICOVIR-5 en CMM

humanas, haciendo por tanto que la célula infectada pase más fácilmente desapercibida al sistema inmunitario del paciente<sup>121</sup>. Una respuesta limitada del sistema inmunitario frente a CMM vehiculadoras de los virus oncolíticos puede mejorar la propia eficacia del tratamiento ya que se mejora su persistencia en el organismo y su capacidad de anidamiento<sup>122</sup>. En este contexto la elección de CMM alogénicas en perros parecen ser adecuadas para ser utilizadas como vehículos de ICOCV-17 dada su capacidad para permanecer silentes frente al sistema inmunitario<sup>121</sup>.

### *Sobre la población inmunitaria intratumoral*

Se ha demostrado que la eficacia de los tratamientos con CRAds y otros virus oncolíticos depende en gran medida de que éstos consigan estimular o activar al sistema inmunitario para que se sustente su actividad antitumoral<sup>22</sup>. El estímulo de la actividad antitumoral puede producirse por la propia lisis de la célula tumoral que hace que se liberen mediadores de la inflamación que facilitará la respuesta inmunitaria frente a la lesión, facilitando el reconocimiento de antígenos específicos del cáncer<sup>123</sup>. Es por ello que a estos tratamientos se les denomina genéricamente como viroinmunoterapia. La importancia que tiene la respuesta inmunitaria en la eficacia de estos tratamientos hace que los perros con gliomas espontáneos sean un modelo particularmente útil en el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento frente a los tumores cerebrales malignos en humanos. En los perros con gliomas espontáneos, su sistema inmunitario está intacto en el momento de iniciar el tratamiento, siendo similar entre ambas especies que están expuestas a los mismos estímulos antigénicos, a diferencia de lo que ocurre con otros modelos experimentales (ratones fundamentalmente) que deben ser modelos inmunodeficientes con xenoinjertos<sup>124,125</sup>.

Se ha demostrado además que la población de TILs en los gliomas caninos es similar a la encontrada en los gliomas humanos<sup>106,126</sup>. En este sentido, la composición de los TILs en los perros tratados con cCelyvir es semejante a la que está

presente en perros con gliomas sin tratamiento y que consiste en una mayor población de linfocitos CD3<sup>+</sup> (linfocitos T) comparados con la cantidad de linfocitos CD20<sup>+</sup> (linfocitos B) y su mayor número en tumores de alto grado<sup>106</sup>. Sin embargo, estos hallazgos no son constantes y contradicen los resultados de otros estudios en los que no se demostró esta composición inmune<sup>126</sup>.

Una de las características más destacables de los gliomas en humanos es su capacidad de evadir la respuesta inmunitaria, cosa que consiguen, entre otros mecanismos, gracias al reclutamiento en el tumor de linfocitos T reguladores (Tregs FOXP3<sup>+</sup>) y la polarización de los macrófagos asociados al tumor hacia un fenotipo M2<sup>127,128</sup>. Los macrófagos M2 poseen una función antiinflamatoria y protumoral y se asocian a un menor tiempo de supervivencia en humanos con GBM<sup>129</sup>. Al igual de lo que sucede con los gliomas humanos, se ha demostrado que el grado histopatológico de los gliomas caninos se relaciona positivamente con el nivel de infiltración por linfocitos Tregs<sup>126,130</sup>. Estos hallazgos no pudieron ser confirmados con los resultados de nuestro estudio ya que únicamente dos perros mostraron TILs FOXP3<sup>+</sup> en su estudio histopatológico (uno de ellos un GBM, paciente 6). Tampoco se apreció una relación entre la respuesta al tratamiento (estadio RAVNO a los dos meses) y el tipo o grado de infiltrado inmune en los estudios histopatológicos *post mortem*. Se desconoce la causa de esta discrepancia, y además el número de perros tratados es bajo, pero es posible especular que el efecto inmunomodulador de las CMMs que vehiculaban el virus oncolítico hiciese que el infiltrado inflamatorio fuese menor o que la población de TILs se polarizase hacia linajes diferentes a los esperados.

Por otro lado, de acuerdo con los resultados obtenidos con el algoritmo CIBERSORT que estimaba la fracciones de diferentes tipos de TILs, los perros que mostraron un beneficio clínico mayor (con enfermedad estable o respuesta parcial) a los dos meses de iniciarse el tratamiento, mostraron una menor infiltración de linfocitos B de memoria y una infiltración mayor de linfocitos

B activados y del linaje celular monocítico/macrofágico. Se ha demostrado que la infiltración de linfocitos T en el tumor juega un papel crítico en la regulación del crecimiento tumoral, pero la función de los linfocitos B está menos definida, aunque recientemente se ha reportado que juegan un papel muy importante en las inmunoterapias<sup>131</sup>. Los perros con lesiones osteolíticas también demostraron cambios en la población de TILs consistentes en una menor cantidad de linfocitos B de memoria y una mayor infiltración del linaje celular monocito/macrófago, que en último término pueden derivar en osteoclastos, y por tanto ser los responsables de la resorción ósea de estos pacientes<sup>132</sup>.

### Eficacia clínica del cCelyvir

La escasez de publicaciones que describen los tiempos de supervivencia en perros con gliomas y la gran cantidad de variables que influyen en su pronóstico, hacen que los resultados de dichas publicaciones con los obtenidos en este estudio no puedan ser completamente equiparables o comparables. Las variables más importantes que deben ser consideradas son:

- La localización de la lesión en el encéfalo (hemisféricos, cerebelares o de tronco encefálico) y particularmente su posición rostral (hemisferios cerebrales y diencefalo) o caudal (cerebelo y resto del tronco del encéfalo)<sup>80</sup>.
- La existencia de un diagnóstico definitivo (basado en hallazgos histopatológicos) o presuntivo (basado en criterios de imagen).
- El tipo y grado histopatológico del glioma, del que solo recientemente se han publicado los estándares histopatológicos para su clasificación<sup>104,133,134</sup>.
- La diversidad de las medidas terapéuticas aplicadas:
  - Tratamientos paliativos mediante antiepilépticos y/o corticoides.

- Diferentes protocolos quimioterápicos, generalmente basados en la temozolamida y, en menor medida, la lomustina.
- Diferentes formas de radioterapia, ya sea con diferentes equipos de radioterapia o con protocolos radioterapéuticos diferentes, tanto en dosis total como en su fraccionamiento.
- Diversidad de técnicas y equipamiento quirúrgico disponible, siendo de particular relevancia el planteamiento quirúrgico (cirugía resectiva parcial, total o supramáxima) y la asistencia durante la cirugía de equipos de neuronavegación, magnificación, marcadores luminiscentes del glioma o aspiradores ultrasónicos.

Todas estas variables deben de afectar directamente a las posibilidades y tiempo de recidiva tal y como se ha demostrado en medicina humana<sup>5</sup>, y se deben tener en cuenta cuando se comparan los resultados obtenidos en los diferentes estudios.

El TMS desde el momento del diagnóstico en perros con tumores cerebrales primarios sometidos a tratamiento paliativo con corticoides y anticonvulsivos es de 69 días, con los tumores rostral ofreciendo un pronóstico significativamente mejor que cuando tienen una localización caudal (178 vs. 28 días)<sup>80</sup>. En ese estudio, a pesar de que los autores describen que no encontraron diferencias significativas en los tiempos de supervivencia de los diferentes tipos de tumor o su grado, no se aporta específicamente el tiempo de supervivencia de los pacientes con gliomas rostrales de alto grado. Un estudio reciente describe un TMS de 26 días en perros con gliomas tratados paliativamente pero tampoco especifica su relación con el grado y la localización del tumor<sup>79</sup>. Otro estudio reciente ha demostrado el beneficio clínico que aporta la administración de lomustina oral comparado con el tratamiento paliativo en el tiempo de supervivencia de perros con diagnóstico presuntivo (basado en pruebas de imagen pero sin confirmación histopatológica) de

gliomas (138 vs. 35 días)<sup>135</sup>. Sin embargo, la eficacia de este tratamiento no pudo demostrarse en estudios previos donde no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de perros tratados con lomustina y aquellos que fueron tratados con antiepilépticos y/o corticoides únicamente (93 vs. 60 días)<sup>136</sup>.

A día de hoy la radioterapia es el principal tratamiento para los gliomas de alto grado, ya sea como única medida terapéutica, o como coadyuvante a otros tratamientos<sup>137</sup>. Los TMS descritos cuando se utiliza la radioterapia como única medida terapéutica para lesiones intraaxiales (sin confirmar histopatológicamente si se tratan de gliomas y su grado), es de 255 días y la combinación de este protocolo radioterapéutico con la cirugía permitió aumentar el TMS en varias semanas, pero no de manera estadísticamente significativa<sup>138</sup>. Hay que tener en cuenta que la precisión de la RM para establecer correctamente el tipo de tumor es de entre un 70% y un 89% según estudios recientes<sup>89,139</sup>. Por ese motivo, los estudios en los que no hay un diagnóstico histopatológico pueden haber incluido pacientes con otros tipos de lesiones (fundamentalmente inflamatorias, que es el principal diagnóstico diferencial de las masas intraaxiales sospechosas de ser gliomas) y por tanto el TMS estar prolongado erróneamente ya que tienen mejores respuestas al tratamiento y tiempos de supervivencia mayores.

Si se considera la cirugía sin ningún tipo de asistencia técnica específica (neuronavegación, magnificación, marcadores luminiscentes tumorales o aspirador ultrasónico) para la resección de gliomas rostrotentoriales se obtienen TMS de 66 o 114 días según el estudio que se tome como referencia<sup>79,140</sup>. Este mismo grupo de investigadores ha evaluado recientemente los resultados en pacientes con gliomas de alto y bajo grado (II a IV) sometidos a cirugía en las mismas condiciones, pero incluyendo un paciente con una lesión caudotentorial (cerebelar) y añadiendo temozolamida como tratamiento coadyuvante a una dosis de entre 76.4 y 181.8mg/m<sup>2</sup>/ 24 horas durante 5 días cada 3 semanas, habiendo obtenido un TMS de 240 días. Uno de los perros

tuvo dos cirugías de rescate<sup>82</sup>. Por otro lado, una instrumentación microquirúrgica y la administración de clorambucilo y lomustina intratumoral en 8 perros permitió alcanzar un TMS de 257 días en otro estudio reciente<sup>141</sup>.

En centros de investigación que aplican nuevas terapias médicas asociadas a una resección microquirúrgica del tumor (inmunoterapia basada en vacunas con o sin inhibidores de puntos de control inmunitarios, quimioterapia con temozolamida o combinada con timidina kinasa/ Flt3L o terapia génica con IFN- $\gamma$ ), se describen TMS de 723 días para pacientes con tumores grado II, 301 días para los de grado III y 200 días para los GBM (grado IV)<sup>76</sup>. Estos resultados son destacables, ya que el resto de estudios evaluados no permiten establecer diferencias significativas entre los tiempos de supervivencia de los pacientes con gliomas de diferentes grados, pero sí en relación al volumen de la masa tratada con radioterapia, combinada o no con temozolamida, determinándose que aquellos perros que tenían un volumen tumoral relativo (porcentaje del volumen tumoral con respecto al volumen total del calvario) <5% tuvieron mejores tiempos de supervivencia<sup>81</sup>. El volumen total sin embargo, no parece estar relacionado con el pronóstico<sup>142</sup>.

En nuestro estudio no se encontró relación entre el volumen del tumor y la supervivencia, pero todos los pacientes tenían tumores con un volumen relativo mayor al 5%. Tampoco se encontró una relación entre la respuesta clínica y el TMS y la localización específica del tumor, lo que es algo habitual en las lesiones rostrotentoriales<sup>79</sup>. Por otro lado, cabe destacar que 3 de los 7 perros a los que se les realizó la RM de revisión a los dos meses de iniciarse el tratamiento manifestaron un incremento en el volumen tumoral, llegando a duplicar su tamaño en dos de ellos. Este efecto pudo estar debido al crecimiento natural del tumor, lo que indicaría su gran agresividad, o a una pseudo-progresión, tal y como se ha observado en humanos con gliomas recurrentes de alto grado tratados con inyecciones intratumorales de DNX-2401 (un adenovirus oncolítico humano homólogo al ICOVIR-5)<sup>37</sup> y en perros

con tumores cerebrales tratados mediante la administración intratecal del virus Zika<sup>19</sup>. En estos casos, el incremento del volumen tumoral, que apareció pronto tras el inicio del tratamiento, fue reemplazado por una reducción progresiva del tamaño del tumor, y se considera un signo de inflamación asociado al tratamiento. También se ha observado este efecto de pseudo-progresión en humanos con GBM tras la aplicación de obleas impregnadas en carmustina<sup>143</sup>. Sin embargo, es poco probable que esta fuese la situación en los perros tratados con cCelyvir ya que la evaluación histopatológica de los tumores en necropsias no demostraron un infiltrado inflamatorio exuberante, y en ninguno de estos tres casos se pudo confirmar una posterior reducción en el volumen tumoral debido a la progresión de la enfermedad, que hizo que los pacientes fueran sacrificados 117, 40 y 61 días y su estado clínico no permitió la realización de nuevas RM.

Puesto que no existe un criterio consensuado para la evaluación de las inmunoterapias en medicina veterinaria, se han seguido los criterios RAVNO, en los que el incremento del volumen tumoral no se considera que pueda ser debido a una pseudo-progresión tal y como se contempla en los criterios específicos de respuesta inmunitaria en el tratamiento de tumores sólidos en medicina humana. Esto hizo que los dos pacientes con un incremento mayor de su volumen tumoral entrasen en el grupo de pacientes con enfermedad progresiva mientras que tres de ellos, uno con un incremento del volumen de un 8% y otros dos con una pequeña reducción del volumen tumoral, entrasen en el grupo de enfermedad estable (**Figura 14**).

Teniendo en cuenta las limitaciones anteriormente mencionadas, y los resultados referidos en las publicaciones previas, se puede asegurar que el tratamiento con cCelyvir mejoró los TMS medidos desde el diagnóstico y el inicio de tratamiento (123 y 90 días respectivamente) si se comparan con los TMS de los perros tratados paliativamente (26 días) o con cirugía (66 días). El escaso beneficio clínico del cCelyvir comparado con determinadas medidas terapéuticas:

radioterapia particularmente o la combinación de cirugía y quimioterapia, contrasta con los resultados obtenidos en los estudios que evalúan la efectividad del cCelyvir en perros con tumores sólidos extracraneales donde se ha demostrado un 14.8% de remisiones completas<sup>94</sup>. Este escaso efecto del tratamiento con cCelyvir para mejorar los tiempos de supervivencia media de perros con gliomas rostrorotenciales de alto grado podría estar justificado por una miríada de dificultades que se exponen a continuación. Aunque estas dificultades ya fueron consideradas en el momento de la preparación de este tratamiento experimental cabe replantearse de nuevo para tratar de encontrar la medida de solventarlas en futuros ensayos clínicos.

### Justificaciones para la limitada eficacia de cCelyvir

#### *Retraso o llegada inadecuada de cCelyvir al SNC por secuestro de las CMMs en los pulmones y otros órganos*

Dado que los estudios precedentes ya han demostrado la capacidad del ICOCAV-17 de infectar a las CMMS y éstas de anidar adecuadamente en neoplasias sólidas extracraneales<sup>94,144</sup>, cabe pensar en la posibilidad de que el estatus clínico de los perros y la medicación recibida hizo que las CMMs infectadas alogénicas quedasen mayoritariamente secuestradas en los pulmones u otros órganos, impidiendo que llegasen a la lesión intracraneal. Este secuestro es algo descrito en la literatura y que supone un inconveniente en la utilización de las CMMs como agentes terapéuticos<sup>145</sup>. En contra de esta posibilidad, el estudio ha demostrado la presencia de ICOCAV-17 en los gliomas de los tres perros en los que se evaluó (pacientes 1, 6 y 10) (**Figura 19**). El efecto de cCelyvir tras su administración sistémica en los órganos de perros con tumores extracraneales ya ha sido descrito, y demuestra una distribución multisistémica del ICOCAV-17 asociada a una infiltración linfoplasmocítica en tracto digestivo, hígado y riñones, donde las células linfoides también expresaron proteínas virales intracelularmente, además de en los tumores y las metástasis<sup>112</sup>. Cabe destacar que tanto el tipo como el

grado de inflamación fue independiente del número de dosis de cCelyvir recibida y del tiempo transcurrido entre la última dosis y la evaluación *post mortem* del paciente<sup>112</sup>. Estos datos sugieren que el proceso desencadenado por el cCelyvir es mantenido en el tiempo y que la replicación del virus puede autoperpetuarse en células en rápido ciclo de división. Desafortunadamente, ese artículo no recoge los resultados de la biodistribución del adenovirus en el sistema nervioso, lo que ayudaría a esclarecer si este órgano también se ve afectado tras la administración de cCelyvir a pesar de que no haya un proceso inflamatorio o neoplásico en el mismo.

Por otro lado, en ratas se ha demostrado que la mayor parte de las CMMs alogénicas mueren en las primeras 48 horas tras ser inoculadas por vía endovenosa y que son indetectables tras 14 días<sup>51,146</sup>. Sin embargo, hay que considerar que el tiempo de replicación de un adenovirus humano salvaje en una célula hospedadora es de unas 72 horas, motivo por el cual las CMMs infectadas con CRAds podrían llegar al tumor antes de ser eliminadas<sup>24</sup>. Si esto ocurriese cuando cCelyvir no ha llegado a su destino, el ICOCAV-17 se liberaría sistémicamente, justificando el gran aumento en la titulación de anticuerpos encontrada en nuestro estudio tras las primeras dosis de tratamiento y la reducida eficacia del mismo debido a la inactivación antes de llegar al tumor. Las CMMs y el ICOCAV-17 son detectadas en los tumores caninos implantados en el flanco de ratones desnudos a las 24 horas de su inoculación<sup>94</sup>. Desconocemos si el acceso de cCelyvir al SNC y por tanto al glioma, podría verse dificultado por la existencia de la BHE o si las modificaciones realizadas en el adenovirus hacen que su ciclo replicativo sea más lento (ya que son incapaces de replicarse en células sin deficiencia en la vía del retinoblastoma), lo que, en primer lugar retrasaría el acceso de las CMMs al tumor y, en el segundo caso, haría que el virus no se pudiera replicar en las células tumorales que no tuvieran alteraciones en la ruta del Rb ni se encontrasen en estado replicativo. Cabe destacar, que a diferencia de lo que se realizó en el

primer estudio de seguridad y eficacia de Celyvir en humanos en el que las CMMs fueron irradiadas previamente a su infección por el ICOVIR-5 (un tipo de CRAds humano precursor del ICOCAV-17), este procedimiento de irradiación previa no se realizó en las CMMs caninas<sup>58,59</sup>. Por tanto, la viabilidad y capacidad de migración y anidamiento de las CMMs caninas no deberían haberse visto afectadas negativamente.

Para determinar si la falta de anidamiento de las CMMs infectadas fue la causa de la escasa eficacia del cCelyvir en perros con gliomas de alto grado se debería considerar la realización de un estudio de biodistribución del cCelyvir en los mismos, cuantificando las CMMs que son capaces de acceder al encéfalo y el tiempo en que lo hacen.

#### *Las CMMs podrían no tener la capacidad de anidamiento en gliomas caninos*

Como se ha mencionado previamente, ya ha quedado demostrado que el virus vehiculado por CMMs puede distribuirse por otros órganos no afectados por un proceso de carácter inflamatorio o neoplásico tras su administración sistémica<sup>112</sup>. Pero cabe por otro lado suponer que las CMMs podrían no tener capacidad de migrar o de anidar en los gliomas caninos. Se ha demostrado que las células de glioma U87, U251 y LN229 sí que inducen una migración clara de las CMMs en ratones con xenoinjertos murinos intracraneales de dichas células tumorales<sup>68</sup>. Está aceptado que el tropismo de las CMMs por los gliomas está mediado por factores secretados por las células tumorales que pueden asemejarse a tejidos dañados y, por tanto, que incluyan factores tróficos como citoquinas derivadas del tumor, diversas quimiocinas y factores de crecimiento<sup>50</sup>. También se han implicado algunos factores inflamatorios como el factor de crecimiento de transformación  $\beta$ 1 (TGF-  $\beta$ 1) que es liberado por muchos gliomas, estando su receptor TGF-  $\beta$ RII presente en CMMs y este factor se ha implicado en la atracción de estas células hacia xenoinjertos tumorales en ratones tras su administración intravascular<sup>147</sup>. El tropismo de las CMMs hacia

los gliomas también puede estar justificado por las señales angiogénicas inducidas en los estados de hipoxia en los alrededores del tumor, haciendo que estas CMMs respondan a la hipoxia estimulando la presentación de determinados receptores de membrana como el CXCR4, uPAR, VEGF receptor 2 y HGFR<sup>50</sup>.

Dado que las alteraciones moleculares en los gliomas caninos y los gliomas humanos de alto grado son muy similares, cabe suponer que la capacidad de anidamiento de las CMMs caninas será similar a la descrita en células humanas<sup>84</sup>. En nuestro estudio se ha demostrado mediante marcadores inmunohistoquímicos que el adenovirus estaba presente en las inmediaciones o en el propio tumor (**Figura 19**), lo que indica que de alguna manera, ya sea vehiculizado por CMMs o libremente, el adenovirus pudo acceder al tumor dentro del sistema nervioso.

Un estudio específico que evaluase la capacidad de anidamiento de las CMMs en ratones con xenoinjertos de gliomas caninos podría establecer si efectivamente los gliomas caninos ejercen ese efecto de llamada para las CMMs cargadas con adenovirus oncolíticos.

#### *Impermeabilidad de la BHE para las CMMs*

Existen múltiples estudios que demuestran que las CMMs anidan activamente en los tumores sólidos<sup>56</sup> y se reconoce que las CMMs pueden migrar hacia los gliomas tras su inyección intracraneal<sup>69</sup>, y que pueden dirigirse hacia los tumores cerebrales tras su inyección intra-arterial en ratones<sup>70</sup>. Ciertos estudios han demostrado que las células madre humanas procedentes de médula ósea pueden migrar hacia gliomas de tronco encefálico tras su inyección en una vena de la cola en ratones desnudos<sup>148</sup>, mientras que otros han demostrado la ineficiencia del anidamiento de este tipo de células madre en modelos de rata singénicos de glioma<sup>149</sup>. Una explicación plausible para la aparente ineficacia de la vía intravenosa, y no de la intracraneal, puede ser debido a un efecto de primer paso con secuestro de las células en el pulmón u otros órganos<sup>70</sup>.

La BHE es otra de las barreras que el cCelyvir debe superar para ser eficaz. En condiciones normales la BHE evita que la mayor parte de las células pasen al tejido cerebral y solo un pequeño número de células madre lo consiguen<sup>150</sup>. No existen estudios detallados que describan cuánto de activa es esta barrera para las CMMs cuando se utilizan con fines terapéuticos sin que exista una patología cerebral que pueda alterar su permeabilidad, pero algunos artículos reflejan la utilidad del manitol (un diurético osmótico) para mejorar la eficiencia de las CMMs en el paso de la BHE<sup>61</sup>. La administración intra-arterial selectiva y la administración mejorada por convección también pueden ayudar a la mejor difusión de estas CMMs a través de la BHE posiblemente mejorando su efectividad<sup>151</sup>. Cualquiera de estas estrategias para la administración de cCelyvir deberá ser considerada en futuras investigaciones.

#### *ICOCAV-17 podría no ser efectivo en tumores gliales caninos de alto grado*

Está bien demostrado que la mayor parte de los gliomas tienen alteraciones en la vía del Rb<sup>38</sup> y se ha demostrado que los adenovirus humanos se pueden replicar en células de gliomas caninos *in vitro* y en el cerebro de perros *in vivo*<sup>152</sup>. Sin embargo, los adenovirus tienen diferentes infectividades entre las diferentes líneas celulares de los gliomas<sup>153</sup>, siendo posible que ICOCAV-17 no se replique o infecte células de gliomas caninos de alto grado. Este hecho no obstante resultaría sorprendente, ya que vectores adenovirales basados en CAV-2 han demostrado un alto tropismo por la infección de neuronas en diversos modelos animales, aunque es cierto que con menos efectividad en las células gliales<sup>154</sup>. Este hecho también contrastaría con los prometedores resultados que ofrece el tratamiento en humanos con el adenovirus oncolítico DNX-2401, en los que se consiguió una mejoría en el tiempo de supervivencia de los pacientes con gliomas recurrentes de alto grado tras su administración intratumoral, con algunos casos que mostraron una respuesta completa a los tres años, a pesar de recaídas posteriores. Esta eficacia fue mayor en términos de incremento de TMS si además de la

administración del virus se realizaba una resección en bloque (9.5 vs. 13 meses)<sup>37</sup>.

### *Las características específicas del sistema inmunitario del SNC y la inconsistencia de la reacción inmunitaria provocada por el ICOCAV-17*

Uno de los resultados más notables de este estudio consiste en el hecho de que, a pesar de haberse podido demostrar la presencia de ICOCAV-17 en las células tumorales y de que existió una respuesta inmunitaria sistémica aparentemente efectiva frente a dicho virus (dada la elevación del título de anticuerpos tras la primera administración de cCelyvir), la infiltración inmunitaria tumoral no fue ni más intensa ni tenía unas características diferenciales comparadas con la población inmune normal de los gliomas de perros sin tratamiento. Como ya se ha comentado previamente, es posible que las CMMS que vehiculaban el virus oncolítico tuviesen un efecto inmunomodulador o evitasen la exposición del virus al sistema inmunitario una vez hubiesen accedido al SNC. Por otro lado, cabe suponer, que el efecto citolítico del virus fuese escaso, de tal manera que no se produjesen productos de la degradación celular o mediadores de la inflamación capaces de atraer a la población inmune del sistema nervioso. Las escasas alteraciones detectadas en los niveles de citoquinas sistémicas en los pacientes tratados apoyan esta segunda hipótesis.

En modelos murinos inmunocompetentes la administración en el SNC y el tracto respiratorio de vectores adenovirales basados en CAV-2 resultó en una respuesta menos inmunogénica que al utilizar vectores adenovirales basados en HAd5 humanos, e indujo menos células CD4+ y CD8+ infiltrantes y un nivel más bajo de secreción de TNF- $\alpha$ . Estos datos podrían indicar una potencial falta de infección, captura, presentación y maduración de las células dendríticas por CAV-2, lo que generaría una menor respuesta inmune del sistema innato, haciendo que los CRADs basados en CAV-2 generasen una menor respuesta inmune antitumoral<sup>155</sup>. Sin embargo, una vez más, este hecho contrastaría con la alta activa-

ción del sistema inmune intratumoral que se vio en el ensayo clínico canino con cCelyvir en tumores extracraneales<sup>94</sup>.

En suma, a pesar de todos estos condicionantes, los resultados de este ensayo clínico con un virus oncolítico específico canino vehiculado con CMMS alogénicas para el tratamiento de gliomas rostrorotatoriales espontáneos en la especie canina han permitido identificar algunas de las claves que pueden ser necesarias para la mejora en el diseño del tratamiento y el desarrollo de nuevas líneas de investigación.

### **Nuevas líneas de investigación**

#### *Combinación de tratamientos experimentales con terapias clásicas.*

En medicina humana el tratamiento de elección para los gliomas de alto grado consiste en una resección quirúrgica máxima o supramáxima, ya que la resección completa de la lesión captante de contraste (de al menos un 98% de su volumen) se relaciona con una mayor supervivencia<sup>77</sup>. Si, además de la resección de la lesión captante de contraste, se resecan sus límites peritumorales (evidenciado como áreas de hiperintensidad perilesional en secuencias FLAIR) el tiempo de supervivencia es aún mayor<sup>78</sup>. Tras la resección quirúrgica, los humanos con gliomas de alto grado son sometidos a radioterapia y a quimioterapia con temozolamida.

Existen varios motivos por los que el efecto de la cirugía en la mejora de la supervivencia de los perros con gliomas rostrorotatoriales sea limitado (tan solo 66 días de TMS)<sup>140</sup>. Este resultado se debe, muy probablemente, a la realización de resecciones tumorales incompletas, ya sea debido a la falta de una instrumentación adecuada, al diagnóstico en base a TC y no RM (lo que no permite identificar con fiabilidad los límites reales de la lesión) o a la ausencia de aspiradores ultrasónicos, neuronavegadores o de marcadores tumorales en la práctica clínica rutinaria<sup>140</sup>. No obstante, la mayor disponibilidad de la instrumentación neuroquirúrgica y la experiencia creciente en neurocirugía veterinaria puede ayudar a revertir esta situación<sup>137</sup>.

Otras medidas terapéuticas que han demostrado su eficacia en la mejoría de la supervivencia de perros con gliomas rostrorotacionales de alto grado, como la combinación de cirugía y temozolamida<sup>82</sup>, o la radioterapia con o sin temozolamida<sup>81,156,157</sup> podrían asimismo verse beneficiadas en cotratamientos con virus oncolíticos ya que puede existir un efecto sinérgico<sup>21</sup>. Tanto los agentes quimioterápicos como la radioterapia provocan la muerte celular por daño en el ADN de las células tumorales, y los adenovirus oncolíticos modulan los mecanismos de reparación del ADN de las células tumorales para incrementar la sensibilización del tumor frente a quimioterápicos y radioterapia<sup>158,159</sup>.

#### *Administración del virus oncolítico mediante inyección intratumoral*

La realización de una cirugía para la resección del tumor puede aportar, además de los beneficios intrínsecos a la misma (reducción inmediata del volumen tumoral), la posibilidad de la administración intra- o peritumoral de los virus oncolíticos, evitando de esta manera las complicaciones derivadas de su administración sistémica y, por tanto, la necesidad de su vehiculización mediante CMMs. Por estos motivos ésta es la vía de administración más frecuentemente utilizada en los ensayos clínicos en humanos con gliomas de alto grado<sup>15,23,160,161</sup>. Hay que destacar que esta nueva modalidad terapéutica ya está siendo puesta en práctica en el HCV-UAX y es objeto de una nueva tesis doctoral y consiste en la inoculación peritumoral del virus ICOCAV-15 en perros con gliomas de alto grado sometidos a resección quirúrgica subtotal sin instrumentación específica.

En ese mismo procedimiento quirúrgico, se podría valorar la colocación de mecanismos para la liberación continuada del virus o la administración de quimioterápicos directamente en el tumor, mediante la impregnación en polímeros de liberación retardada o la implantación de catéteres para la administración de fármacos mejorada por convección, que habitualmente se colocan mediante cirugía estereotáctica<sup>143,162,163</sup>.

#### *Modificación del virus oncolítico para mejorar su efecto citolítico / reducir su potencial efecto osteoclástico*

Un hallazgo inesperado en el estudio fue la resorción de huesos del calvario en tres de los cuatro pacientes que fueron evaluados mediante TC *post mortem*. Se desconoce si este hallazgo es consecuencia de la acción del virus, su vehiculización por CMMs o de si se trata de una situación habitual en pacientes con glioma de alto grado frecuentemente pasada por alto en perros debido a que no se lleva un seguimiento tan estrecho como el realizado en el estudio. No obstante se trata de una consideración a tener en cuenta para estudios futuros, ya sea evitando la administración de ICOCAV-17 en favor de virus en los que no se ha insertado la secuencia que codifica la hialuronidasa, o bien realizando además un seguimiento radiológico mediante TC además de RM a todos los pacientes tratados. Es en parte por este motivo por el que se prefirió la administración intratumoral de ICOCAV-15 (sin el gen que codifica la hialuronidasa) en lugar de ICOCAV-17 en los estudios que se están llevando a cabo actualmente en el HCV-UAX.

Se deben además, evaluar las posibles modificaciones para mejorar, tanto su tropismo celular como su efecto citolítico. La identificación de líneas celulares de gliomas caninos, y su cultivo y diferenciación es fundamental en este proceso para la realización de estudios preclínicos *in vitro* que demuestren este mejor efecto que los virus utilizados en la actualidad. La modificación de los virus con transgenes funcionales que tenga un efecto estimulante del sistema inmunitario frente al tumor es otro de los mecanismos más prometedores en el tratamiento de diversos tipos de cáncer incluyendo los gliomas<sup>12</sup>.

#### *Potenciación de la respuesta inmunitaria frente a las células tumorales.*

Dado que uno de los hallazgos más significativos encontrados en este tratamiento experimental ha sido la escasa significación que aparentemente ha tenido el sistema inmunitario, se deben considerar medidas terapéuticas que ayuden a

---

mejorar la respuesta inmunitaria frente a las células tumorales, ya que esta respuesta inmunitaria tiene un efecto antitumoral que podría ser incluso mayor que la acción intrínseca del virus oncolítico<sup>123</sup>.

En este contexto, la administración conjunta de un virus oncolítico, ya sea mediante la administración intratumoral directa tras la resección quirúrgica o gracias a la esterotáxia, junto con inhibidores de puntos de control inmunitarios, podría mejorar la eficacia del tratamiento de los gliomas<sup>14,164</sup>, estando ya investigada en perros con gliomas espontáneos de alto grado<sup>165</sup>.

## Bibliografía

1. Ostrom QT, Cioffi G, Gittleman H, Patil N, Waite K, Kruchko C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012–2016. *Neuro-Oncol.* 2019;21(Supplement\_5):v1-100.
2. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncol.* 2021;23(8):1231-51.
3. Bush NAO, Chang SM, Berger MS. Current and future strategies for treatment of glioma. *Neurosurg Rev.* 2017;40(1):1-14.
4. Young RM, Jamshidi A, Davis G, Sherman JH. Current trends in the surgical management and treatment of adult glioblastoma. *Ann Transl Med.* 2015;3(9):121
5. Delgado-López PD, Corrales-García EM. Survival in glioblastoma: a review on the impact of treatment modalities. *Clin Transl Oncol.* 2016;18(11):1062-71.
6. Stupp R, Weller M, Belanger K, Bogdahn U, Ludwin SK, Lacombe D, et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352(10):987-96.
7. Jackson CM, Choi J, Lim M. Mechanisms of immunotherapy resistance: lessons from glioblastoma. *Nat Immunol.* 2019;20(9):1100-9.
8. Sundar SJ, Hsieh JK, Manjila S, Lathia JD, Sloan A. The role of cancer stem cells in glioblastoma. *Neurosurg Focus.* 2014;37(6):E6.
9. Muir M, Gopakumar S, Traylor J, Lee S, Rao G. Glioblastoma multiforme: novel therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets.* 2020;24(7):605-14.
10. Sampson JH, Gunn MD, Fecci PE, Ashley DM. Brain immunology and immunotherapy in brain tumours. *Nat Rev Cancer.* 2020;20(1):12-25.
11. Kim JW, Chang AL, Kane JR, Young JS, Qiao J, Lesniak MS. Gene Therapy and Virotherapy of Gliomas. *Prog Neurol Surg.* 2018;32:112-123.
12. Fukuhara H, Ino Y, Todo T. Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn. *Cancer Sci.* 2016;107(10):1373-9.
13. Moreno Ayala MA, Candolfi M. Terapia génica citotóxica para el tratamiento del cáncer cerebral. *Neurol Argent.* 2014;6(4):217-24.
14. Raja J, Ludwig JM, Gettinger SN, Schalper KA, Kim HS. Oncolytic virus immunotherapy: future prospects for oncology. *J Immunother Cancer.* 2018;6(1):140.
15. Kiyokawa J, Wakimoto H. Preclinical And Clinical Development Of Oncolytic Adenovirus For The Treatment Of Malignant Glioma. *Oncolytic Virotherapy.* 2019;8:27-37.
16. Gállego Pérez-Larraya J, Garcia-Moure M, Labiano S, Patiño-García A, Dobbs J, Gonzalez-Huarriz M, et al. Oncolytic DNX-2401 Virus for Pediatric Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *N Engl J Med.* 2022;386(26):2471-81.
17. Friedman GK, Johnston JM, Bag AK, Bernstock JD, Li R, Aban I, et al. Oncolytic HSV-1 G207 Immunovirotherapy for Pediatric High-Grade Gliomas. *N Engl J Med.* 2021;384(17):1613-22.
18. Chambers MR, Foote JB, Bentley RT, Botta D, Crossman DK, Manna DLD, et al. Evaluation of immunologic parameters in canine glioma patients treated with an oncolytic herpes virus. *J Transl Genet Genomics.* 2021;5(4):423-442.
19. Kaid C, Madi RADS, Astray R, Goulart E, Cairnes-Junior LC, Mitsugi TG, et al. Safety, Tumor Reduction, and Clinical Impact of Zika Virus Injection in Dogs with Advanced-Stage Brain Tumors. *Mol Ther.* 2020;28(5):1276-86.
20. Bommareddy PK, Shettigar M, Kaufman HL. Integrating oncolytic viruses in combination cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(8):498-513.
21. Suryawanshi YR, Schulze AJ. Oncolytic Viruses for Malignant Glioma: On the Verge of Success? *Viruses.* 2021;13(7):1294.
22. Russell SJ, Peng KW, Bell JC. Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol.* 2012;30(7):658-70.
23. Wollmann G, Ozduman K, Van Den Pol AN. Oncolytic Virus Therapy for Glioblastoma Multiforme: Concepts and Candidates. *Cancer J.* 2012;18(1):69-81.
24. Desheva Y. Introductory Chapter: Human Adenoviruses. En: Desheva Y, editor. *Adenoviruses.* IntechOpen; 2019

25. Singh S, Kumar R, Agrawal B. Adenoviral Vector-Based Vaccines and Gene Therapies: Current Status and Future Prospects. En: Desheva Y, editor. Adenoviruses. IntechOpen; 2019
26. M. Rojas J, Sevilla N, Martín V. Adenovirus as Tools in Animal Health. En: Desheva Y, editor. Adenoviruses. IntechOpen; 2019
27. Heise C, Kirn DH. Replication-selective adenoviruses as oncolytic agents. *J Clin Invest.* 2000;105(7):847-51.
28. Rodriguez R, Schuur ER, Lim HY, Henderson GA, Simons JW, Henderson DR. Prostate Attenuated Replication Competent Adenovirus (ARCA) CN706: A selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Res.* 1997;57(13):2559-63.
29. Liu C, Zhang Y, Liu MM, Zhou H, Chowdhury W, Lupold SE, et al. Evaluation of continuous low dose rate versus acute single high dose rate radiation combined with oncolytic viral therapy for prostate cancer. *Int J Radiat Biol.* 2010;86(3):220-9.
30. Barker DD, Berk' AI. Adenovirus Proteins from Both El B Reading Frames Are Required for Transformation of Rodent Cells by Viral Infection and DNA Transfection. *Virology.* 1987;156(1):107-21.
31. Jakubczak JL, Ryan P, Gorziglia M, Clarke L, Hawkins LK, Hay C, et al. An Oncolytic Adenovirus Selective for Retinoblastoma Tumor Suppressor Protein Pathway-defective Tumors: Dependence on E1A, the E2F-1 Promoter, and Viral Replication for Selectivity and Efficacy. *Cancer Res.* 2023;63(7):1490-9.
32. Fueyo J, Gomez-Manzano C, Alemany R, Lee PS, McDonnell TJ, Mitlianga P, et al. A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene.* 2000;19(1):2-12.
33. Alonso MM, Cascallo M, Gomez-Manzano C, Jiang H, Bekele BN, Perez-Gimenez A, et al. ICOVIR-5 Shows E2F1 Addiction and Potent Antiglioma Effect *In vivo.* *Cancer Res.* 2007;67(17):8255-63.
34. Heise CC, Williams AM, Xue S, Propst M, Kirn DH. Intravenous Administration of ONYX-015, a Selectively Replicating Adenovirus, Induces Antitumoral Efficacy. *Cancer Res.* 1999;59(11):2623-8.
35. Kirn D. Clinical research results with dl1520 (Onyx-015), a replication-selective adenovirus for the treatment of cancer: what have we learned? *Gene Ther.* 2001;8(2):89-98.
36. 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.
37. Lang FF, Conrad C, Gomez-Manzano C, Yung WKA, Sawaya R, Weinberg JS, et al. Phase I Study of DNX-2401 (Delta-24-RGD) Oncolytic Adenovirus: Replication and Immunotherapeutic Effects in Recurrent Malignant Glioma. *J Clin Oncol.* 2018;36(14):1419-27.
38. Fueyo J, Alemany R, Gomez-Manzano C, Fuller GN, Khan A, Conrad CA, et al. Preclinical Characterization of the Antiglioma Activity of a Tropism-Enhanced Adenovirus Targeted to the Retinoblastoma Pathway. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2003;95(9):652-60.
39. Suzuki K, Fueyo J, Krasnykh V, Reynolds PN, Curiel DT, Alemany R. A Conditionally Replicative Adenovirus with Enhanced Infectivity Shows Improved Oncolytic Potency. *Clin Cancer Res.* 2001;7(1):120-6.
40. Rojas JJ, Cascallo M, Guedan S, Gros A, Martinez-Quintanilla J, Hemminki A, et al. A modified E2F-1 promoter improves the efficacy to toxicity ratio of oncolytic adenoviruses. *Gene Ther.* 2009;16(12):1441-51.
41. Rojas JJ, Guedan S, Searle PF, Martinez-Quintanilla J, Gil-Hoyos R, Alcayaga-Miranda F, et al. Minimal RB-responsive E1A Promoter Modification to Attain Potency, Selectivity, and Transgene-arming Capacity in Oncolytic Adenoviruses. *Mol Ther.* 2010;18(11):1960-71.
42. Guedan S, Rojas JJ, Gros A, Mercade E, Cascallo M, Alemany R. Hyaluronidase Expression by an Oncolytic Adenovirus Enhances Its Intratumoral Spread and Suppresses Tumor Growth. *Mol Ther.* 2010;18(7):1275-83.
43. Laborda E, Puig-Saus C, Rodriguez-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.
44. Gladson CL, Cheresht DA. Glioblastoma Expression of Vitronectin and the alpha v beta 3 inte-

- grin. Adhesion mechanism for transformed glial cells. *J Clin Invest*. 1991;88(6):1924-32.
45. Fuxe J, Liu L, Malin S, Philipson L, Collins VP, Pettersson RF. Expression of the coxsackie and adenovirus receptor in human astrocytic tumors and xenografts. *Int J Cancer*. 2003;103(6):723-9.
  46. Ulasov IV, Borovjagin AV, Schroeder BA, Baryshnikov AY. Oncolytic adenoviruses: A thorny path to glioma cure. *Genes Dis*. 2014;1(2):214-26.
  47. Russell SJ, Peng KW. Oncolytic Virotherapy: A Contest between Apples and Oranges. *Mol Ther*. 2017;25(5):1107-16.
  48. Ferguson MS, Lemoine NR, Wang Y. Systemic Delivery of Oncolytic Viruses: Hopes and Hurdles. *Adv Virol*. 2012;2012:1-14.
  49. Stuckey DW, Shah K. Stem cell-based therapies for cancer treatment: separating hope from hype. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(10):683-91.
  50. Parker Kerrigan BC, Hossain A, Yamashita S, Lang FF. Stem Cell Therapy of Gliomas. *Prog Neurol Surg*. 2018;32:124-51.
  51. Kranzler J, Tyler M, Sonabend A, Ulasov I, Lesniak M. Stem Cells as Delivery Vehicles for Oncolytic Adenoviral Virotherapy. *Curr Gene Ther*. 2009;9(5):389-95.
  52. Karp JM, Leng Teo GS. Mesenchymal Stem Cell Homing: The Devil Is in the Details. *Cell Stem Cell*. 2009;4(3):206-16.
  53. Jones BJ, McTaggart SJ. Immunosuppression by mesenchymal stromal cells: From culture to clinic. *Exp Hematol*. 2008;36(6):733-41.
  54. Ankrum JA, Ong JF, Karp JM. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nat Biotechnol*. 2014;32(3):252-60.
  55. Schu S, Nosov M, O'Flynn L, Shaw G, Treacy O, Barry F, et al. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells. *J Cell Mol Med*. 2012;16(9):2094-103.
  56. Ramirez M, Garcia-Castro J, Melen G, Gonzalez-Murillo A, Franco L. Patient-derived mesenchymal stem cells as delivery vehicles for oncolytic virotherapy: novel state-of-the-art technology. *Oncolytic Virotherapy*. 2015;4:149-55.
  57. Wang X, Zhao X, He Z. Mesenchymal stem cell carriers enhance anti-tumor efficacy of oncolytic virotherapy (Review). *Oncol Lett*. 2021;21(4):238.
  58. Melen GJ, Franco-Luzón L, Ruano D, González-Murillo Á, Alfranca A, Casco F, et al. Influence of carrier cells on the clinical outcome of children with neuroblastoma treated with high dose of oncolytic adenovirus delivered in mesenchymal stem cells. *Cancer Lett*. 2016;371(2):161-70.
  59. García-Castro J, Alemany R, Cascalló M, Martínez-Quintanilla J, Del Mar Arriero M, Lassaletta Á, et al. Treatment of metastatic neuroblastoma with systemic oncolytic virotherapy delivered by autologous mesenchymal stem cells: an exploratory study. *Cancer Gene Ther*. 2010;17(7):476-83.
  60. Treacy O, Ryan AE, Heinzl T, O'Flynn L, Cregg M, Wilk M, et al. Adenoviral Transduction of Mesenchymal Stem Cells: In Vitro Responses and In Vivo Immune Responses after Cell Transplantation. *PLoS ONE*. 2012;7(8):e42662.
  61. Sherman LS, Romagano MP, Williams SF, Rameshwar P. Mesenchymal stem cell therapies in brain disease. *Semin Cell Dev Biol*. 2019;95:111-9.
  62. Liu L, Eckert MA, Riazifar H, Kang DK, Agalliu D, Zhao W. From Blood to the Brain: Can Systemically Transplanted Mesenchymal Stem Cells Cross the Blood-Brain Barrier? *Stem Cells Int*. 2013;2013:1-7.
  63. Dong H, Gang L, Meng H, Yue-chen L, Gong W, Mingliang Z. How can mesenchymal stem cells (mscs) penetrate the blood brain barrier (bbb) ? *Turk Neurosurg*. 2018;28(6):1013-1014.
  64. Ali S, Xia Q, Muhammad T, Liu L, Meng X, Bars-Cortina D, et al. Glioblastoma Therapy: Rationale for a Mesenchymal Stem Cell-based Vehicle to Carry Recombinant Viruses. *Stem Cell Rev Rep*. 2022;18(2):523-43.
  65. Lang FF, Bruner JM, Fuller GN, Aldape K, Prados MD, Chang S, et al. Phase I Trial of Adenovirus-Mediated p53 Gene Therapy for Recurrent Glioma: Biological and Clinical Results. *J Clin Oncol*. 2003;21(13):2508-18.
  66. Sonabend AM, Ulasov IV, Tyler MA, Rivera AA, Mathis JM, Lesniak MS. Mesenchymal Stem Cells Effectively Deliver an Oncolytic Adenovirus to Intracranial Glioma. *Stem Cells*. 2008;26(3):831-41.
  67. Nakamura K, Ito Y, Kawano Y, Kurozumi K, Kobune M, Tsuda H, et al. Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Ther*. 2004;11(14):1155-64.
  68. Nakamizo A, Marini F, Amano T, Khan A, Studený M, Gumin J, et al. Human Bone Marrow-

- Derived Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Gliomas. *Cancer Res.* 2005;65(8):3307-18.
69. Martinez-Quintanilla J, He D, Wakimoto H, Alemany R, Shah K. Encapsulated Stem Cells Loaded With Hyaluronidase-expressing Oncolytic Virus for Brain Tumor Therapy. *Mol Ther.* 2015;23(1):108-18.
70. Yong RL, Shinojima N, Fueyo J, Gumin J, Vecil GG, Marini FC, et al. Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells for Intravascular Delivery of Oncolytic Adenovirus  $\Delta$ 24-RGD to Human Gliomas. *Cancer Res.* 2009;69(23):8932-40.
71. Fares J, Ahmed AU, Ulasov IV, Sonabend AM, Miska J, Lee-Chang C, et al. Neural stem cell delivery of an oncolytic adenovirus in newly diagnosed malignant glioma: a first-in-human, phase 1, dose-escalation trial. *Lancet Oncol.* 2021;22(8):1103-14.
72. Ruano D, López-Martín JA, Moreno L, Lassaletta Á, Bautista F, Andiñón M, et al. First-in-Human, First-in-Child Trial of Autologous MSCs Carrying the Oncolytic Virus Icovir-5 in Patients with Advanced Tumors. *Mol Ther.* 2020;28(4):1033-42.
73. Buonavoglia C, Martella V. Canine respiratory viruses. *Vet Res.* 2007;38(2):355-73.
74. Decaro N, Martella V, Buonavoglia C. Canine Adenoviruses and Herpesvirus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2008;38(4):799-814.
75. Hicks WH, Bird CE, Pernik MN, Haider AS, Dobariya A, Abdullah KG, et al. Large Animal Models of Glioma: Current Status and Future Prospects. *Anticancer Res.* 2021;41(11):5343-53.
76. Hubbard ME, Arnold S, Bin Zahid A, McPheeters M, Gerard O'Sullivan M, Tabaran AF, et al. Naturally Occurring Canine Glioma as a Model for Novel Therapeutics. *Cancer Invest.* 2018;36(8):415-23.
77. Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, et al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg.* 2001;95(2):190-8.
78. Li YM, Suki D, Hess K, Sawaya R. The influence of maximum safe resection of glioblastoma on survival in 1229 patients: Can we do better than gross-total resection? *J Neurosurg.* 2016;124(4):977-88.
79. José López R, Gutierrez Quintana R, Fuente C, Manzanilla EG, Suñol A, Pi Castro D, et al. Clinical features, diagnosis, and survival analysis of dogs with glioma. *J Vet Intern Med.* 2021;35(4):1902-17.
80. Rossmeisl JH, Jones JC, Zimmerman KL, Robertson JL. Survival time following hospital discharge in dogs with palliatively treated primary brain tumors. *J Am Vet Med Assoc.* 2013;242(2):193-8.
81. Dolera M, Malfassi L, Bianchi C, Carrara N, Finesso S, Marcarini S, et al. Frameless stereotactic radiotherapy alone and combined with temozolomide for presumed canine gliomas. *Vet Comp Oncol.* 2018;16(1):90-101.
82. Hidalgo Crespo E, Farré Mariné A, Pumarola i Battle M, Borrego Massó JF, Luján Feliu-Pascual A. Survival Time after Surgical Debulking and Temozolomide Adjuvant Chemotherapy in Canine Intracranial Gliomas. *Vet Sci.* 2022;9(8):427.
83. Herranz C, Fernández F, Martín-Ibáñez R, Blasco E, Crespo E, De La Fuente C, et al. Spontaneously Arising Canine Glioma as a Potential Model for Human Glioma. *J Comp Pathol.* 2016;154(2-3):169-79.
84. Amin SB, Anderson KJ, Boudreau CE, Martinez-Ledesma E, Kocakavuk E, Johnson KC, et al. Comparative Molecular Life History of Spontaneous Canine and Human Gliomas. *Cancer Cell.* 2020;37(2):243-257.e7.
85. Paoloni M, Khanna C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(2):147-56.
86. Robertson I. Optimal magnetic resonance imaging of the brain: mr imaging of the brain. *Vet Radiol Ultrasound.* 2011;52:S15-22.
87. Konar M, Lang J. Pros and cons of low-field magnetic resonance imaging in veterinary practice. *Vet Radiol Ultrasound.* 2011;52:S5-14.
88. Stadler KL, Ruth JD, Pancotto TE, Werre SR, Rossmeisl JH. Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging Are Equivalent in Mensuration and Similarly Inaccurate in Grade and Type Predictability of Canine Intracranial Gliomas. *Front Vet Sci.* 2017;4:157.
89. Ródenas S, Pumarola M, Gaitero L, Zamora À, Añor S. Magnetic resonance imaging findings in 40 dogs with histologically confirmed intracranial tumours. *Vet J.* 2011;187(1):85-91.
90. Bentley RT, Ober CP, Anderson KL, Feeney DA, Naughton JF, Ohlfest JR, et al. Canine intracra-

- nial gliomas: Relationship between magnetic resonance imaging criteria and tumor type and grade. *Vet J.* 2013;198(2):463-71.
91. Amphimaque B, Durand A, Oevermann A, Vidondo B, Schweizer D. Grading of oligodendroglioma in dogs based on magnetic resonance imaging. *J Vet Intern Med.* 2022;36(6):2104-12.
  92. Motta L, Altay UM, Kelly D, Skerritt GC. Non-enhancing confirmed oligodendroglioma in three dogs. *J Small Anim Pract.* 2011;52(4):227.
  93. Young BD, Levine JM, Porter BF, Chen-Allen AV, Rossmeisl JH, Platt SR, et al. Magnetic resonance imaging features of intracranial astrocytomas and oligodendrogliomas in dogs. *Vet Radiol Ultrasound.* 2011;52(2):132-41.
  94. Cejalvo T, Perisé-Barrios AJ, Del Portillo I, Laborda E, Rodríguez-Milla MA, Cubillo I, et al. Remission of Spontaneous Canine Tumors after Systemic Cellular Viroimmunotherapy. *Cancer Res.* 2018;78(17):4891-901.
  95. Alcayaga-Miranda F, Cascallo M, Rojas JJ, Pastor J, Alemany R. Osteosarcoma cells as carriers to allow antitumor activity of canine oncolytic adenovirus in the presence of neutralizing antibodies. *Cancer Gene Ther.* 2010;17(11):792-802.
  96. Bayo-Puxan N, Cascallo M, Gros A, Huch M, Fillat C, Alemany R. Role of the putative heparan sulfate glycosaminoglycan-binding site of the adenovirus type 5 fiber shaft on liver detargeting and knob-mediated retargeting. *J Gen Virol.* 2006;87(9):2487-95.
  97. Rossmeisl JH, Garcia PA, Daniel GB, Bourland JD, Debinski W, Dervisis N, et al. invited review-neuroimaging response assessment criteria for brain tumors in veterinary patients. *Vet Radiol Ultrasound.* 2014;55(2):115-32.
  98. 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.
  99. Garcia Mora JK, Robertson J, Hsu F, Shinn RL, Larson MM, Rylander CG, et al. Comparison of linear and volumetric criteria for the determination of therapeutic response in dogs with intracranial gliomas. *J Vet Intern Med.* 2022;36(3):1066-74.
  100. Johnson PJ, Rivard BC, Wood JH, DiRubio ML, Henry JG, Miller AD. Relationship between histological tumor margins and magnetic resonance imaging signal intensities in brain neoplasia of dogs. *J Vet Intern Med.* 2022;36(3):1039-48.
  101. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol (Berl).* 2007;114(2):97-109
  102. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, Von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol (Berl).* 2016;131(6):803-20.
  103. Higgins RJ, Bollen AW, Dickinson PJ, Sisó-Llonch S. Tumors of the Nervous System. En: Meuten DJ, editor. *Tumors in Domestic Animals.* Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2016. p. 834-91.
  104. Koehler JW, Miller AD, Miller CR, Porter B, Aldape K, Beck J, et al. A Revised Diagnostic Classification of Canine Glioma: Towards Validation of the Canine Glioma Patient as a Naturally Occurring Preclinical Model for Human Glioma. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2018;77(11):1039-54.
  105. Chen B, Khodadoust MS, Liu CL, Newman AM, Alizadeh AA. Profiling Tumor Infiltrating Immune Cells with CIBERSORT. *Methods Mol Biol.* 2018;1711:243-259.
  106. Pi Castro D, José-López R, Fernández Flores F, Rabanal Prados RM, Mandara MT, Arús C, et al. Expression of FOXP3 in Canine Gliomas: Immunohistochemical Study of Tumor-Infiltrating Regulatory Lymphocytes. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2020;79(2):184-93.
  107. Song RB, Vite CH, Bradley CW, Cross JR. Post-mortem Evaluation of 435 Cases of Intracranial Neoplasia in Dogs and Relationship of Neoplasm with Breed, Age, and Body Weight. *J Vet Intern Med.* 2013;27(5):1143-52.
  108. Goodenberger ML, Jenkins RB. Genetics of adult glioma. *Cancer Genet.* 2012;205(12):613-21.
  109. Snyder JM, Shofer FS, Winkle TJV, Massicotte C. Canine Intracranial Primary Neoplasia: 173 Cases (1986–2003). *J Vet Intern Med.* 2006;20(3):669-75.
  110. Kani Y, Cecere TE, Lahmers K, LeRoith T, Zimmerman KL, Isom S, et al. Diagnostic accuracy of stereotactic brain biopsy for intracranial neoplasia in dogs: Comparison of biopsy, surgical

- resection, and necropsy specimens. *J Vet Intern Med.* 2019;33(3):1384-91.
111. Smith BF, Curiel DT, Ternovoi VV, Borovjagin AV, 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.
  112. Gómez A, Sardón D, Cejalvo T, Vázquez F, García-Castro J, Perisé-Barrios AJ. Biodistribution Analysis of Oncolytic Adenoviruses in Canine Patient Necropsy Samples Treated with Cellular Virotherapy. *Mol Ther - Oncolytics.* 2020;18:525-34.
  113. Cunningham DA, Lowe LH, Shao L, Acosta NR. Neuroradiologic characteristics of astroblastoma and systematic review of the literature: 2 new cases and 125 cases reported in 59 publications. *Pediatr Radiol.* 2016;46(9):1301-8.
  114. Lee Y, Van Tassel P. Intracranial oligodendrogliomas: imaging findings in 35 untreated cases. *Am J Roentgenol.* 1989;152(2):361-9.
  115. Recio A, De La Fuente C, Pumarola M, Espada Y, Añor S. Magnetic resonance imaging and computed tomographic characteristics of a glioma causing calvarial erosion in a dog. *Vet Radiol Ultrasound.* 2019;60(1):E1-5.
  116. Moon HS, Jung S, Jung TY, Cao VT, Moon KS, Kim IY. Possible Role of Matrix Metalloproteinase in Osteolytic Intracranial Meningiomas. *J Korean Neurosurg Soc.* 2010;47(1):11.
  117. Hidari K, Nakamoto Y, Sakurai K, Sakurai Y, Nibe K, Nakamoto M. Case report: Presumptive subcutaneous malignant peripheral nerve sheath tumor with intracranial invasion and osteolysis in the posterior fossa of a dog. *Front Vet Sci.* 2022;9:977099.
  118. Dussaux A, Gomes E, Hurion M, Rattiez E, Mayousse V. Cerebral meningioma associated with extensive calvarium osteolysis and presumed intratumoral carcinoma metastasis in a cat. *J Feline Med Surg Open Rep.* 2022;8(2):205511692211228.
  119. Sánchez D, Cesarman-Maus G, Amador-Molina A, Lizano M. Oncolytic Viruses for Canine Cancer Treatment. *Cancers.* 2018;10(11):404.
  120. Bowick GC, Fennewald SM, Scott EP, Zhang L, Elsom BL, Aronson JF, et al. Identification of Differentially Activated Cell-Signaling Networks Associated with Pichinde Virus Pathogenesis by Using Systems Kinomics. *J Virol.* 2007;81(4):1923-33.
  121. Rodríguez-Milla MÁ, Morales-Molina A, Perisé-Barrios AJ, Cejalvo T, García-Castro J. AKT and JUN are differentially activated in mesenchymal stem cells after infection with human and canine oncolytic adenoviruses. *Cancer Gene Ther.* 2021;28(1-2):64-73.
  122. Morales-Molina A, Rodríguez-Milla MÁ, Gamba S, Cejalvo T, De Andrés B, Gaspar ML, et al. Toll-like Receptor Signaling-deficient Cells Enhance Antitumor Activity of Cell-based Immunotherapy by Increasing Tumor Homing. *Cancer Res Commun.* 2023;3(3):347-60.
  123. Melcher A, Parato K, Rooney CM, Bell JC. Thunder and Lightning: Immunotherapy and Oncolytic Viruses Collide. *Mol Ther.* 2011;19(6):1008-16.
  124. Dow S. A Role for Dogs in Advancing Cancer Immunotherapy Research. *Front Immunol.* 2020;10:2935.
  125. Bentley RT, Ahmed AU, Yanke AB, Cohen-Gadol AA, Dey M. Dogs are man's best friend: in sickness and in health. *Neuro-Oncol.* 2017;19(3):312-322.
  126. Krane GA, O'Dea CA, Malarkey DE, Miller AD, Miller CR, Tokarz DA, et al. Immunohistochemical evaluation of immune cell infiltration in canine gliomas. *Vet Pathol.* 2021;58(5):952-63.
  127. Ooi YC, Tran P, Ung N, Thill K, Trang A, Fong BM, et al. The role of regulatory T-cells in glioma immunology. *Clin Neurol Neurosurg.* 2014;119:125-32.
  128. Wu A, Wei J, Kong LY, Wang Y, Priebe W, Qiao W, et al. Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia. *Neuro-Oncol.* 2010;12(11):1113-25.
  129. Gjorgjevski M, Hannen R, Carl B, Li Y, Landmann E, Buchholz M, et al. Molecular profiling of the tumor microenvironment in glioblastoma patients: correlation of microglia/macrophage polarization state with metalloprotease expression profiles and survival. *Biosci Rep.* 2019;39(6):BSR20182361.
  130. El Andaloussi A, Lesniak MS. CD4+CD25+FoxP3+ T-cell infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with tumor grade in human gliomas. *J Neurooncol.* 2007;83(2):145-52.
  131. Downs-Canner SM, Meier J, Vincent BG, Serody JS. B Cell Function in the Tumor Microenvironment. *Annu Rev Immunol.* 2022;40(1):169-93.

132. Madel MB, Ibáñez L, Wakkach A, De Vries TJ, Teti A, Apparailly F, et al. Immune Function and Diversity of Osteoclasts in Normal and Pathological Conditions. *Front Immunol.* 2019;10:1408.
133. Krane GA, Shockley KR, Malarkey DE, Miller AD, Miller CR, Tokarz DA, et al. Inter pathologist agreement on diagnosis, classification and grading of canine glioma. *Vet Comp Oncol.* 2022;20(4):881-9.
134. Merickel JL, Pluhar GE, Rendahl A, O'Sullivan MG. Prognostic histopathologic features of canine glial tumors. *Vet Pathol.* 2021;58(5):945-51.
135. Moirano SJ, Dewey CW, Wright KZ, Cohen PW. Survival times in dogs with presumptive intracranial gliomas treated with oral lomustine: A comparative retrospective study (2008-2017). *Vet Comp Oncol.* 2018;16(4):459-66.
136. Van Meervenne S, Verhoeven PS, De Vos J, Gielen IMVL, Polis I, Van Ham LML. Comparison between symptomatic treatment and lomustine supplementation in 71 dogs with intracranial, space-occupying lesions: Lomustine intracranial masses. *Vet Comp Oncol.* 2014;12(1):67-77.
137. Dickinson PJ. Advances in Diagnostic and Treatment Modalities for Intracranial Tumors. *J Vet Intern Med.* 2014;28(4):1165-85.
138. Brearley MJ, Jeffery ND, Phillips SM, Dennis R. Hypofractionated Radiation Therapy of Brain Masses in Dogs: A Retrospective Analysis of Survival of 83 Cases (1991-1996). *J Vet Intern Med.* 1999;13(5):408-12.
139. Wanamaker MW, Vernau KM, Taylor SL, Cissell DD, Abdelhafez YG, Zwingenberger AL. Classification of neoplastic and inflammatory brain disease using MRI texture analysis in 119 dogs. *Vet Radiol Ultrasound.* 2021;62(4):445-54.
140. Suñol A, Mascort J, Font C, Bastante AR, Pumarola M, Feliu-Pascual AL. Long-term follow-up of surgical resection alone for primary intracranial rostral tentorial tumors in dogs: 29 cases (2002-2013). *Open Vet J.* 2017;7(4):375-383.
141. Bentley RT, Thomovsky SA, Miller MA, Knapp DW, Cohen-Gadol AA. Canine (Pet Dog) Tumor Microsurgery and Intratumoral Concentration and Safety of Metronomic Chlorambucil for Spontaneous Glioma: A Phase I Clinical Trial. *World Neurosurg.* 2018;116:e534-42.
142. Heidner GL, Kornegay JN, Page RL, Dodge RK, Thrall DE. Analysis of Survival in a Retrospective Study of 86 Dogs with Brain Tumors. *J Vet Intern Med.* 1991;5(4):219-26.
143. Juratli TA, Schackert G, Krex D. Current status of local therapy in malignant gliomas — A clinical review of three selected approaches. *Pharmacol Ther.* 2013;139(3):341-58.
144. Delgado-Bonet P, Tomeo-Martín BD, Ortiz-Díez G, Perisé-Barrios AJ. Tumor-Homing of Mesenchymal Stem Cells Infected with Oncolytic Virus in a Canine Patient. *Vet Sci.* 2022;9(6):285.
145. Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, et al. Systemic Delivery of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells to the Infarcted Myocardium: Feasibility, Cell Migration, and Body Distribution. *Circulation.* 2003;108(7):863-8.
146. Kidd S, Spaeth E, Dembinski JL, Dietrich M, Watson K, Klopp A, et al. Direct Evidence of Mesenchymal Stem Cell Tropism for Tumor and Wounding Microenvironments Using In Vivo Bioluminescent Imaging. *Stem Cells.* 2009;27(10):2614-23.
147. Shinojima N, Hossain A, Takezaki T, Fueyo J, Gumin J, Gao F, et al. TGF- Mediates Homing of Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells to Glioma Stem Cells. *Cancer Res.* 2013;73(7):2333-44.
148. Yang B, Wu X, Mao Y, Bao W, Gao L, Zhou P, et al. Dual-targeted antitumor effects against brainstem glioma by intravenous delivery of tumor necrosis factor-related, apoptosis-inducing, ligand-engineered human mesenchymal stem cells. *Neurosurgery.* 2009;65(3):610-24.
149. Bexell D, Gunnarsson S, Tormin A, Darabi A, Gisselsson D, Roybon L, et al. Bone Marrow Multipotent Mesenchymal Stroma Cells Act as Pericyte-like Migratory Vehicles in Experimental Gliomas. *Mol Ther.* 2009;17(1):183-90.
150. Conaty P, Sherman LS, Naaldijk Y, Ulrich H, Stolzing A, Rameshwar P. Methods of Mesenchymal Stem Cell Homing to the Blood-Brain Barrier. *Methods Mol Biol.* 2018;1842:81-91.
151. Srinivasan VM, Lang FF, Kan P. Intraarterial delivery of virotherapy for glioblastoma. *Neurosurg Focus.* 2021;50(2):E7.
152. Candolfi M, Pluhar GE, Kroeger K, Puntel M, Curtin J, Barcia C, et al. Optimization of adenoviral vector-mediated transgene expression in the canine brain in vivo, and in canine glioma cells in vitro. *Neuro-Oncol.* 2007;9(3):245-58.

153. Paul CPL, Everts M, Dent P, Fisher PB, Ulasov IV, Lesniak MS, et al. Characterization of infectivity of knob-modified adenoviral vectors in glioma. *Cancer Biol Ther.* 2008;7(5):786-93.
154. Soudais C, Laplace-Builhe C, Kissa K, Kremer EJ. Preferential transduction of neurons by canine adenovirus vectors and their efficient retrograde transport *in vivo*. *FASEB J.* 2001;15(12):1-23.
155. Bru T, Salinas S, Kremer EJ. An Update on Canine Adenovirus Type 2 and Its Vectors. *Viruses.* 2010;2(9):2134-53.
156. Moirano SJ, Dewey CW, Haney S, Yang J. Efficacy of frameless stereotactic radiotherapy for the treatment of presumptive canine intracranial gliomas: A retrospective analysis (2014–2017). *Vet Comp Oncol.* 2020;18(4):528-37.
157. Debreuque M, De Fornel P, David I, Delisle F, Ducerveau MN, Devauchelle P, et al. Definitive-intent uniform megavoltage fractionated radiotherapy protocol for presumed canine intracranial gliomas: retrospective analysis of survival and prognostic factors in 38 cases (2013–2019). *BMC Vet Res.* 2020;16(1):412.
158. Spencer DA, Young JS, Kanojia D, Kim JW, Polster SP, Murphy JP, et al. Unlocking the promise of oncolytic virotherapy in glioma: combination with chemotherapy to enhance efficacy. *Ther Deliv.* 2015;6(4):453-68.
159. O’Cathail SM, Pokrovska TD, Maughan TS, Fisher KD, Seymour LW, Hawkins MA. Combining Oncolytic Adenovirus with Radiation—A Paradigm for the Future of Radiosensitization. *Front Oncol.* 2017;7:153.
160. Rius-Rocabert S, García-Romero N, García A, Ayuso-Sacido A, Nistal-Villan E. Oncolytic Virotherapy in Glioma Tumors. *Int J Mol Sci.* 2020;21(20):7604.
161. Chiocca EA, Abbed KM, Tatter S, Louis DN, Hochberg FH, Barker F, et al. A Phase I Open-Label, Dose-Escalation, Multi-Institutional Trial of Injection with an E1B-Attenuated Adenovirus, ONYX-015, into the Peritumoral Region of Recurrent Malignant Gliomas, in the Adjuvant Setting. *Mol Ther.* 2004;10(5):958-66.
162. Dickinson PJ, LeCouteur RA, Higgins RJ, Bringas JR, Larson RF, Yamashita Y, et al. Canine spontaneous glioma: A translational model system for convection-enhanced delivery. *Neuro-Oncol.* 2010;12(9):928-40.
163. Desjardins A, Gromeier M, Herndon JE, Beaubier N, Bolognesi DP, Friedman AH, et al. Recurrent Glioblastoma Treated with Recombinant Poliovirus. *N Engl J Med.* 2018;379(2):150-61.
164. Wang X, Guo G, Guan H, Yu Y, Lu J, Yu J. Challenges and potential of PD-1/PD-L1 checkpoint blockade immunotherapy for glioblastoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019;38(1):87.
165. Chambers MR, Bentley RT, Crossman DK, Foote JB, Koehler JW, Markert JM, et al. The One Health Consortium: Design of a Phase I Clinical Trial to Evaluate M032, a Genetically Engineered HSV-1 Expressing IL-12, in Combination With a Checkpoint Inhibitor in Canine Patients With Sporadic High Grade Gliomas. *Front Surg.* 2020;7:59.

# Systemic cellular viroimmunotherapy for canine high-grade gliomas

Ana Cloquell <sup>1</sup>, Isidro Mateo <sup>1,2</sup>, Stefano Gambera <sup>3,4</sup>, Martí Pumarola,<sup>5</sup>  
Ramon Alemany,<sup>6</sup> Javier García-Castro <sup>3</sup>, Ana Judith Perisé-Barrios <sup>7</sup>

**To cite:** Cloquell A, Mateo I, Gambera S, *et al.* Systemic cellular viroimmunotherapy for canine high-grade gliomas. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 2022;**10**:e005669. doi:10.1136/jitc-2022-005669

► Additional supplemental material is published online only. To view, please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/jitc-2022-005669>).

AC and IM contributed equally. JG-C and AJP-B contributed equally.

Accepted 19 October 2022

## ABSTRACT

**Background** Oncolytic viruses constitute a growing field of interest, both in human and veterinary oncology, given that they are particularly helpful for treating non-surgical tumors and disseminated cancer, such as high-grade gliomas. Companion dogs present malignant gliomas with biological, genetic, phenotypic, immunological, and clinical similarities to human gliomas. These features favor comparative approaches, leading to the treatment of canine oncological patients to achieve translational applications to the human clinic. The systemic administration of oncolytic viruses presents a challenge due to their limitations in effectively targeting tumors and metastases. Therefore, the aim of this study is to evaluate the safety and antitumor activity of a virotherapy used in spontaneous canine tumors.

**Methods** Ten dogs with high-grade rostrotentorial gliomas underwent weekly systemic endovenous cellular virotherapy with dCelyvir (canine mesenchymal stem cells infected with the canine oncolytic adenovirus ICOCV17) for 8 weeks. Efficacy was determined in seven dogs according to the Response Assessment in Veterinary Neuro-Oncology criteria considering clinical status and MRI measurements. Medical history, physical and neurological examinations, and vaccination status were evaluated prior to and during follow-up. Safety was evaluated by physical examinations and hematological and biochemical changes in peripheral blood. Immune populations were analyzed by flow cytometry in peripheral blood and by gene expression and immunohistochemistry in the tumor microenvironment.

**Results** The treatment was well tolerated and major adverse effects were not observed. Two dogs had partial responses (76% and 86% reduction in tumor size), and 3/7 showed stable disease. ICOCV17 was detected in peripheral blood in nine dogs, and a correlation between the ICOCV17 particles and anti-canine adenovirus (CAV) antibodies was observed. ICOCV17 was detected in 3/9 tumor tissues after necropsies. Regarding tumor-infiltrating lymphocytes, the dogs with disease stabilization and partial response tended to have reduced memory B-cell infiltration and increased monocyte/macrophage lineage cells.

**Conclusions** These findings indicate that dCelyvir is safe and presents efficacy in canine rostrotentorial high-grade gliomas. These data are relevant to the ongoing phase Ib regulated human clinical trial that is administering this virotherapy to children, adolescents, and young adults with diffuse pontine glioma. Celyvir should be further explored as a treatment in veterinary and human neuro-oncology.

## WHAT IS ALREADY KNOWN ON THIS TOPIC

⇒ High-grade gliomas have a poor short-term prognosis, despite the use of the most advanced or aggressive therapies when possible, and the efficacy of oncolytic viruses is limited by difficulties in targeting brain tumors. Therapies, therefore, need to be improved to reach the brain.

## WHAT THIS STUDY ADDS

⇒ The systemic endovenous treatment is safe, ensures that the virus is delivered to the brain tumor, and response evaluation suggest clinical efficacy.

## HOW THIS STUDY MIGHT AFFECT RESEARCH, PRACTICE OR POLICY

⇒ These data are relevant to the ongoing phase Ib regulated human clinical trial that is already administering this virotherapy to children, adolescents, and young adults with diffuse pontine glioma.

## BACKGROUND

Oncolytic viruses (OVs) as therapeutic agents constitute a growing field of interest, both in human and veterinary oncology with several ongoing clinical trials and promising results.<sup>1</sup> OVs can reverse the microenvironment's immunosuppressive status<sup>2</sup> and induce intratumoral immunostimulatory signals increasing immune cell infiltration.<sup>3</sup> The virus' lytic activity induces the release of tumor neoantigens, leading to an antitumor response.<sup>4,5</sup> Due to its nature and mechanism of action, adenovirus is effective in promoting immune response, controlling tumor growth, and improving survival.<sup>6,7</sup> Conditionally replicating adenoviruses (CRAds) are an option for patients with cancer because CRAds have a selective potential for replication, achieving a successful viral cycle in tumor cells, resulting in cell destruction. Most CRAds rely on tumor-specific promoters to control the master key gene E1a and in deletions in domains of E1 genes that are needed to block cell cycle regulators such as pRB or p53. Due to the lack of function of such regulatory proteins in tumors, such deletion only has a detrimental effect on virus replication



© Author(s) (or their employer(s)) 2022. Re-use permitted under CC BY-NC. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

For numbered affiliations see end of article.

### Correspondence to

Dr Javier García-Castro; [jgcastro@isciii.es](mailto:jgcastro@isciii.es)



in normal cells but not in tumor cells. CRAds can also be genetically modified to enhance their infectivity and/or intratumoral spread.<sup>8</sup>

The use of CRAds can be particularly helpful for treating non-surgical tumors, such as high-grade gliomas.<sup>9,10</sup> Glioblastoma multiforme (GBM) is the most frequent malignant primary brain tumor in dogs and humans, and the standard patient care includes incomplete surgical resection combined with radiation and/or chemotherapy; unfortunately, these treatments achieve a poor short-term prognosis in humans and dogs.<sup>11</sup> Treatment with CRAds has shown promising results in veterinary trials, and further in human clinical trials including a phase I using intratumoral injections of DNX-2401, showing clinical benefit in 12% of cases, with long-term survival in patients with recurrent high-grade gliomas, and a link to an immune-mediated response.<sup>12,13</sup> Further, the infusion of OV DNX-2401 followed by radiotherapy in pediatric patients with diffuse intrinsic pontine glioma resulted in a reduction or stabilization of tumor size.<sup>14</sup>

Although CRAds have also been systemically administered, they have shown limited efficacy due to various barriers that viral particles encounter in targeting neoplastic lesions, such as neutralization in blood and liver uptake.<sup>15</sup> Intracranial solid tumors are not always surgically accessible, and the intratumoral delivery of CRAds is not a feasible option for these patients in the regular clinic. To improve the systemic administration of CRAds, the use of mesenchymal stem cells (MSCs) as cellular carriers for CRAds in humans and dogs has been previously demonstrated.<sup>6,16</sup> MSCs were infected *in vitro* with CRAds and employed as a 'Trojan horse', avoiding systemic immunity against the virus and even further reaching the tumor due to their tumor-homing capacity. This treatment, named Celyvir, has been demonstrated to be effective in humans and canine patients without secondary effects or toxicity.<sup>6,17</sup>

The most complete study developed in the veterinary field have been performed using a canine oncolytic adenovirus named ICOCAV17.<sup>6</sup> This CRAd has the same characteristics as the human oncolytic adenovirus ICOVIR17 (used in clinical trials as VCN-01): In particular, ICOCAV17 has four palindromic E2F to repress E1a promoter in normal cells though the E2F-pRB complex and to activate E1a expression in tumor cells through free E2F. In addition, the pRB binding domain of E1a has been deleted in ICOCAV17. To increase its antitumor potency this virus express hyaluronidase linked to the major late promoter and has an RGD motif inserted in the HI-loop of the fiber.<sup>18</sup> In this regard, we previously published a veterinary clinical trial, in which 27 dogs with extracranial solid tumors were treated with canine Celyvir (dCelyvir) by using allogenic canine MSCs (dMSCs) infected with ICOCAV17, showing a response rate of 74%, including 14.8% of complete remission, with an excellent toxicity profile.<sup>6</sup> The safety and efficacy of this treatment in canine intraparenchymal primary brain tumors have never been explored and remain unknown. The results could be

significantly different from those obtained in previous studies in dogs with extracranial tumors, given that the brain environment and the blood-brain barrier can play a role that could affect the clinical outcome. Therefore, it would be useful to describe the dCelyvir therapy effects in a brain tumor population.

Domestic dogs develop spontaneous neoplasms in the central nervous system (CNS),<sup>7,19–21</sup> present intratumor heterogeneity, and have clinical and pathophysiological features and genetic changes equivalent to human CNS tumors.<sup>22,23</sup> The conserved glioma drivers and aneuploidy have been identified as a hallmark of high-grade disease, showing high similarity especially between human pediatric and canine gliomas.<sup>19</sup> In addition, dogs have an intact immune system and present similarities with humans in tumor immune infiltration, making them a valuable immunocompetent model.<sup>19,23–25</sup>

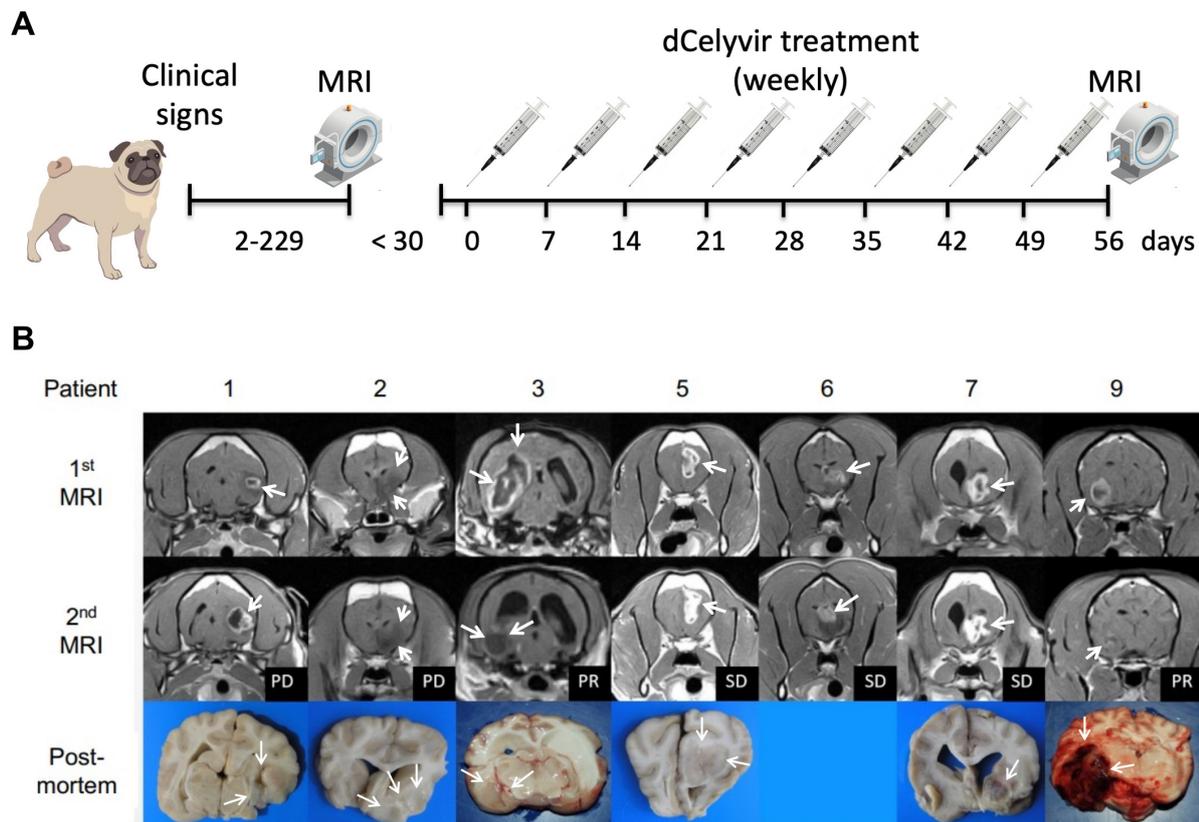
Moreover, the absence of effective gold standards for managing high-grade gliomas in dogs<sup>11,26,27</sup> makes these tumors excellent candidates for developing novel therapeutics, with the aim of obtaining responses allowing comparative approaches that favor a clinical translation of the findings from dogs to humans.<sup>19,20,28</sup> Gliomas are one of the most common tumors in dogs, that represent 36%–70% of primary brain tumors in those animals, which have a poor prognosis due to the lack of an accessible and effective treatment for this disease. Radiotherapy is an expensive treatment and not recommended for some diffuse tumors (unless novel irradiation equipment is available, which unfortunately is not common), and benefit from resection surgery appears to be limited. Fortunately, the availability of advanced imaging for the diagnosis and follow-up, makes dogs excellent animal models to test novel therapeutic strategies, as immunotherapies.<sup>21,26</sup> Therefore, veterinary trials with companion dogs are useful in translational research, and should take a position between basic research and human clinical trials.<sup>25,29,30</sup>

The aim of this study was to evaluate the safety and efficacy of systemic infusions of dCelyvir and its immune-related response in canine patients with high-grade gliomas. The findings will allow us to address improvements in current therapies in human gliomas, leading us to propose the use of the therapy described here as a treatment for people with brain tumors, even as a first line of treatment. The findings reported here are indeed novel and the first to describe the therapy effects in patients with brain tumors.

## MATERIAL AND METHODS

### Patient selection

The study followed the ARRIVE guidelines 2.0, and the information can be found in the manuscript. The study's inclusion criteria were as follows: (1) client-owned dogs with a single intra-axial rostral tentorial mass suspected to be a high-grade glioma based on MRI findings; (2) no previous treatments except for palliative care with



**Figure 1** (A) Schematic representation of the dCelyvir treatment. (B) MRI and macroscopic tumor images from the dCelyvir-treated patients. MRI prior to dCelyvir treatment (first MRI), and 2 months after starting weekly treatment (second MRI) showing tumors (white arrows). Clinical benefit is indicated according to RAVNO criteria. Bottom figures show macroscopic tumor tissue (white arrows) in necropsies. PD, progressive disease; PR, partial response; RAVNO, response assessment in veterinary neuro-oncology; SD, stable disease.

anticonvulsants and/or prednisone; (3) good physical condition with no hematological or biochemical evidence of organ dysfunction; (4) a mild increase in liver enzymes with a normal bile acid stimulation test was considered acceptable in cases under corticosteroid or anticonvulsant therapy; and (5) dogs whose owners declined other therapeutic options such as surgery, radiotherapy, and chemotherapy. Dogs weighing less than 4 kg and dogs with concurrent neoplastic or inflammatory diseases were excluded.

#### Clinical study design

The trial followed a schedule of the weekly intravenous administration of dCelyvir at  $0.5 \times 10^6$  dMSC/kg for 8 weeks, following the previously described protocol.<sup>6</sup> To avoid anaphylactic reactions, dogs were pretreated with metamizol (30 mg/kg/IV) and difenhydramine (0.5 mg/kg/IV). Tumor reevaluation by MRI at 2 months (figure 1A). At diagnosis, all dogs received a tapering course of prednisone for 4 weeks, and phenobarbital was initiated and continued throughout the treatment in the dogs with seizures. The clinical outcome was defined according to the response assessment in veterinary

neuro-oncology (RAVNO) criteria with a modification<sup>31</sup>: lesions were measured even if their longest diameter was smaller than 10 mm. Treatment was discontinued in those dogs with progressive disease (PD) or severe biochemical abnormalities (such as elevation of serum liver enzyme's activity more than three times the upper normal limit). Those dogs with partial response (PR) or stable disease (SD) were selected for a second round of dCelyvir (four doses, every 2 weeks). Adverse effects were defined by the veterinary cooperative oncology group for common terminology criteria of adverse events in dogs and cats. The dogs were followed-up until death, at which point they underwent a necropsy within 24 hours. Samples from the tumor, the unaffected contralateral hemisphere, and the liver were used to perform histopathology and immunohistochemistry, or snap frozen to analyze the RNA expression.

#### Cell culture and dCelyvir preparation

Isolation and characterization of dMSC from the adipose tissue of healthy donor dogs, were performed as previously described.<sup>6</sup> The presence of mycoplasma (MycAlert

Mycoplasma Detection Kit, Lonza) and the preparation of dCelyvir treatment were as previously described.<sup>6</sup>

### MRI and RAVNO criteria

Imaging studies were performed at pre-treatment and 2 months after the first dCelyvir treatment using an MRI unit (Hitachi Airis Mate 0.2T model; Tokio, Japan). The tumor size was calculated considering the contrast-enhancing lesion (online supplemental figure S1A); when no enhancement was detected, the size was calculated by comparing the parenchymal intensity patterns with the normal anatomy (online supplemental figure 1B-C). Peritumoral edema (online supplemental figure 1D-E) and the midline shift were measured (online supplemental figure 1F). Clinical outcomes were defined by RAVNO criteria as follows: complete response, stable or improved clinical status not receiving steroids, elimination of all enhancing tumors and stable or decreased T2W/fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR) lesion burden; PR:  $\geq 50\%$  decrease in the contrast enhancing lesion burden in patients with stable or improved clinical status; SD  $< 50\%$  decrease or  $< 25\%$  increase in enhancing tumor size in a patient with stable or improved clinical status requiring stable or decreased steroid doses; and PD  $\geq 25\%$  increase in enhancing tumor in T2W/FLAIR images, new lesions and/or clinical deterioration. For further details regarding the MRI, see online supplemental information.

### Histopathology, diagnosis, and immunohistochemistry

The morphological evaluation was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded sections stained with hematoxylin and eosin in eight necropsies. Tumors were classified according to the 2007 criteria of the WHO for human CNS tumors<sup>32</sup> and the subsequently revised diagnostic scheme for canine gliomas.<sup>19,28,33</sup> Samples were evaluated for the presence of necrosis, extracellular matrix degradation, vascular proliferation, mucinous secretion, and hemorrhages.

Immunohistochemistry was performed using primary antibodies to detect glial fibrillar acidic protein (Dako Z0334; Glostrup, Denmark), oligodendrocyte transcription factor 2 (Olig2, Merck Millipore AB9610; Billerica, Massachusetts, USA), CD3 (Dako A0452; Glostrup, Denmark), CD20 (Thermo Fisher PA5-32313; Waltham, Massachusetts, USA), FOXP3 (forkhead box P3, eBioscience 14-7979; Waltham, Massachusetts, USA) and ICOCV17 (anti-Ad5 Abcam ab6982). Stained tumor slides were assessed using image analysis software (NanoZoomer Digital Pathology; Hamamatsu, Japan). A number of CD3<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup> and FOXP3<sup>+</sup> lymphocytes were determined. For further details, see online supplemental information.

### Cytokine analysis

Blood samples were obtained at days 0, 1, 2, and 3 and prior to every weekly dCelyvir infusion. Samples were collected in BD vacutainer separator tubes (BD

SSTII-Advance), and serum was obtained and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Quantification of interleukin (IL)-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-15, IL-18, interferon (IFN)- $\gamma$ , CXC chemokine ligand (CXCL)10, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), CC chemokine ligand (CCL)2 and keratinocyte-derived chemokine(KC)-like were performed with an Immunology Multiplex Assay (Milliplex MAP Canine Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel, Millipore; Darmstadt, Germany) following the manufacturer's protocol and were analyzed using Luminex technology.

### Antiviral-specific antibodies

Blood samples were collected in BD vacutainer plasma separator tubes (BD PSTII); then plasma was obtained and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis. To determine specific antibodies (IgG) against canine adenovirus (CAV), a solid-phase ELISA was performed (ImmunoComb Canine VacCheck, Biogal Galed Laboratories Acs.; Kibbutz Galed, Israel) following a previously described protocol.<sup>6</sup>

### DNA extraction from blood and tissues and qPCR analysis

Blood samples were collected in PAXgene Blood DNA tubes and processed using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen; Madrid, Spain) following the manufacturer's instructions. Tumors from necropsies were snap frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  as dried pieces. Tissue samples were introduced into a metal cylinder submerged in liquid nitrogen and ground thoroughly with a pestle until they were completely pulverized. DNA was isolated using the QIAamp DNA Mini Qit (Qiagen). DNA quantification and purity (A260/280 and A260/230) were analyzed with a Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific). Dilutions of ICOCV17 from  $10^8$  to  $10^3$  vp/mL in blood from healthy donors were used for the standard curve. Samples were analyzed in triplicate by the quantitative real-time PCR (qRT-PCR) 7500 Fast (Applied Biosystems; Madrid, Spain) using the Premix Ex Taq (Clontech; Saint-Germain-en-Laye, France), with forward primer (0.5  $\mu\text{mol/L}$ ) 5'TGTGGGCTGTGTGATTCCT-3'; reverse primer (0.5  $\mu\text{mol/L}$ ) 5'-CCAGAATCAGCCTGAG TGCTC-3'; and 10 pmol of Taqman probe FAM-CTCG AATCAGTGTCCAGGCTCCGCA-TAMRA, which identified the E1A region. The qRT-PCR conditions were as follows: holding stage 10 min at  $95^{\circ}\text{C}$ , cycling stage 15 s at  $95^{\circ}\text{C}$  and 1 min at  $60^{\circ}\text{C}$ , repeated 40 times. Analysis was performed using the 7500 Software V.2.0.6 (Applied Biosystems).

### Flow cytometry

Blood samples were collected in a BD vacutainer K3EDTA. Samples were incubated with human FcR Blocking (Miltenyi; Cologne, Germany) for 10 min at room temperature and incubated for 20 min at  $4^{\circ}\text{C}$  with directly conjugated antibodies diluted in phosphate-buffered saline with 1% fetal bovine serum. Samples were incubated with Quickklis buffer (Cytognos; Salamanca, Spain) to lyse erythrocytes. The acquisition and



analysis were conducted in a MacsQuant10 Flow Cytometer (Miltenyi). The antibodies employed and the flow cytometry gating strategy of the immune subpopulation analysis in dog-derived samples have been previously described.<sup>6</sup>

### RNA extraction, gene expression, and tumor-infiltrating immune cell profile

Tumor tissues were snap frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ , and RNA was isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) and was analyzed with a Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific). The RNA Integrity Number was evaluated using the Bioanalyzer RNA 6000 Nano assay, and samples with RIN values higher than 8.6 were used. Tumor RNA expression was analyzed by GeneChip Canine Gene V.1.0 ST Array (Affymetrix). Data were analyzed using Transcriptome Analysis Console Software. Tumor-infiltrating leukocyte cell fractions of 6 tumors were estimated from bulk RNA expression data employing a CIBERSORT algorithm (<https://cibersort.stanford.edu>).<sup>34</sup> The microarray expression matrix of canine tumors was preprocessed to match human gene identifiers with canine orthologues. Leucocyte infiltration was estimated using a validated leukocyte gene signature matrix (LM22); canine orthologues matched 85% of the LM22 gene signature matrix. Analysis was performed in relative mode, with 100 permutation runs and without quantile normalization. The resulting cellular fractions were collapsed from 22 to 11 cell types based on their lineage, as previously described.<sup>34</sup>

### Statistical analysis

The data were graphed and analyzed with Excel 2013 (Microsoft Office 2013) and Prism (GraphPad) Software. Comparisons between quantitative variables were performed with Wilcoxon's rank-sum test, and the Mann-Whitney statistic for samples with non-normal distribution. Differences were considered significant at  $*p<0.05$ ;

$**p<0.01$  and  $***p<0.001$ . To test statistical association between two continuous variables, a Pearson's correlation coefficient test was performed. A two-way analysis of variance and Bonferroni's multiple comparison tests were used to analyze CIBERSORT results.

## RESULTS

### Canine patient demographics and clinical status

Ten dogs were enrolled for the dCelyvir therapy. Brachycephalic breeds were overrepresented (six French bulldogs, two Boxers, and one English bulldog). There were seven males and three females with a median age of 8 years (6–10 years) and a mean weight of 17 kg (4.4–38.8 kg). All the dogs had been vaccinated against CAV2 (table 1), all had experienced seizures, and seven of them showed other prosencephalic signs (abnormal mental status, contralateral hemiparesis, menace response deficits and/or abnormal facial sensation). The mean period from first neurological signs to diagnosis was 40 days (online supplemental table S1). Prednisone treatment was maintained during the entire treatment in five dogs and the other five were treated intermittently (overall, the dogs received prednisone during 73% of the treatment time). All the dogs, except one, received phenobarbital during the entire dCelyvir treatment.

### Safety and toxicity of dCelyvir

In most of the dogs, the dCelyvir treatment was well tolerated, except for one dog who showed a forelimb swelling contralateral to the site of venous catheterization after the first dCelyvir administration. The adverse event was resolved 48 hours after treatment with a single dose of meloxicam (0.2 mg/kg subcutaneous) and difenhydramine (0.5 mg/kg intramuscular). Two dogs showed mild fatigue after treatment on two occasions each.

**Table 1** Patient characteristics, treatment, clinical outcome, and tumor characterization

Patient	Age	Breed	Gender	CAV vacc.	dCelyvir doses	RAVNO	Tumor location	Diagnosis
1	8	French Bulldog	M	8	8	PD	Temp.	Olig. III
2	6	French Bulldog	M	3	11	PD	Frontal	Olig. III
3	7	Poodle	M	1	8	PR	Temp.+Occ.	Olig. III
4	9	English Bulldog	F	11	1	N/A	Temp.+Th.	N/A
5	9	Boxer	F	35	12	SD	Frontal	Olig. III
6	9	Boxer	M	5	14	SD	Frontal	GBM
7	10	French Bulldog	M	4	12	SD	Frontal+Th.	GBM
8	6	French Bulldog	M	5	5	N/A	Frontal+parietal + Temp.+Th.	Olig. III
9	8	French Bulldog	F	10	17	PR	Parietal+Th.	N/A
10	6	French Bulldog	M	3	4	N/A	Frontal	Olig. III

Age in years; CAV vaccination in months.

CAV, canine adenovirus; F, female; GBM, glioblastoma multiforme; M, male; N/A, not available; Occ., Occipital; Olig. III, oligodendroglioma grade III; PD, progressive disease; PR, partial response; RAVNO, response assessment in veterinary neuro-oncology; SD, stable disease; Temp., temporal; Th., thalamus.

There were no significant changes in the complete blood count during the treatment (online supplemental figure S2A). Total protein, albumin, globulin, glucose, urea, creatinine,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  and  $\text{Ca}^{++}$  levels also remained within the reference ranges during the follow-up (online supplemental figure S2B). However, patient 3 had neutrophilic and monocytic leucocytosis (online supplemental figure S2A) and increased urea levels (online supplemental figure S2B) before treatment, which were progressively normalized after the second week of treatment.

Liver enzymes were analyzed to assess whether the dCelyvir treatment affected liver function. Alkaline phosphatase (ALP) levels were increased before the treatment in five dogs and remained elevated in three of them until death (online supplemental figure S2C). Patient 5 was the only one who also showed increased ALP and aspartate transaminase levels during treatment (online supplemental figure S2C). Serum alanine transaminase levels were over the baseline in eight dogs before treatment but were reduced or maintained during treatments, except for patient five who showed a slight increment (online supplemental figure S2C). Most dogs developed neurological complications during treatment (abnormal mental status, seizures, and changes in behavior), which are normally associated with the presence of the brain tumor and could therefore not be attributed to the treatment itself.

The patient 4 experienced severe elevation of liver enzymes attributed to medical treatment with steroids and phenobarbital prior to the dCelyvir treatment. The blood analysis performed 7 days after the treatment showed bilirubinemia, hypoalbuminemia, mild anemia, leukocytosis, and increased bile acids. Due to deteriorating clinical signs and liver dysfunction, the dCelyvir treatment was discontinued, and the dog was euthanized due to experiencing renal and hepatic failure. The final histopathological classification was not available because necropsy was not allowed.

### Imaging findings

Before the dCelyvir treatment, all MRI studies showed the classic radiological features of high-grade gliomas, including the presence of a single intra-axial mass mainly hypointense in T1-weighted images and hyperintense in T2-weighted and FLAIR (online supplemental figure S1). The tumor location varied, affecting multiple lobes (or one lobe and the thalamus) in five dogs (table 1). Contrast enhancement was severe in a ring-like pattern in nine dogs; however, the patient 2 did not have any enhancement (figure 1B). Before treatment, mass areas ranged from  $57 \text{ mm}^2$  to  $670 \text{ mm}^2$  (mean  $281 \text{ mm}^2$ ), and most cases showed mass effect evidenced as ventricular collapse (8/10) and/or midline shift (9/10), ranging from 0 mm to 5.7 mm (mean 3 mm) (online supplemental table S1). Perilesional edema was also observed in most dogs (9/10).

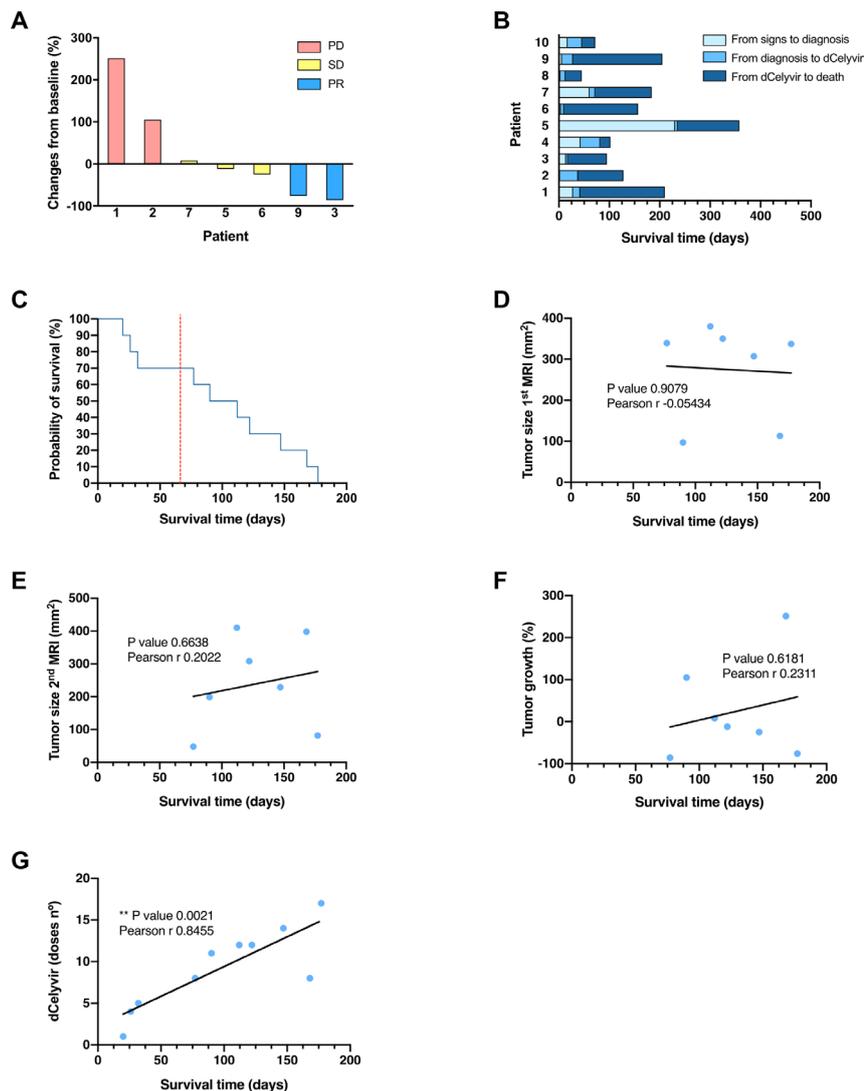
Patient 3 was also imaged by CT after euthanasia to investigate the cause of the jaw pain observed several

weeks before, which could not be attributed to the glioma. The images showed a lesion in the right temporal lobe (online supplemental figure S3A, asterisk) and bilateral bone resorption (online supplemental figure 3B,C, arrows) affecting the orbital area of the frontal bones (online supplemental figure S3D, arrows). Also, the wings of the presphenoid and basisphenoid bones and the ventral area of the temporal bone were affected (online supplemental figure S3E). The bone resorption was more severe ipsilateral to the intracranial tumor. Three dogs subsequently added to the study underwent CT study postmortem even if they did not have any clinical signs suggesting osteolysis of the cranial bones. Two of them (patients 5 and 7) showed bone resorption. Patient 5 showed involvement of the internal lamina of the frontal bone adjacent to the tumor (online supplemental figure S3F). Patient 7 showed bone resorption of the orbital area of the left frontal bone and ethmoid bone (online supplemental figures 3G,H) and bilaterally in the temporal bones, despite the tumor being in the left frontal lobe.

### Clinical outcome

Seven dogs survived more than 2 months after starting the treatment, having a second MRI evaluation (figure 1B). Tumor size and midline shift reduction were observed in 57% (4/7) and 43% (3/7) of dogs, respectively (online supplemental table S1 and figure 2A). The clinical benefit of these seven dogs was evaluated following the RAVNO criteria: two dogs presented PD, three SD, and two PR, showing a reduction of 76% and 86% in tumor size (online supplemental table S1, figures 1 and 2A). The main radiological features of the lesions (type of enhancement, peritumoral edema, and mass effect) changed during the follow-up in two dogs, one of which presented a moderate peritumoral edema prior to treatment that was undetectable after 2 months. The other peritumoral edema progressed from moderate to severe. Four dogs died naturally and six were euthanized due to clinical deterioration at the owner's request. The median survival time (MST) was 128 days from clinical onset, 123 days from diagnosis, and 90 days from the start of the dCelyvir treatment (online supplemental table S1 and figure 2B,C). The number of dCelyvir doses ranged from 1 to 17 (median of 8) (table 1). There was no correlation between survival time (from the start of treatment) and tumor size evaluated at pretreatment (figure 2D) or after 2 months of weekly treatment (figure 2E); and the survival time lacked any correlation with the tumor growth (figure 2F). However, there was a positive correlation ( $r=0.8455$ ) between the number of dCelyvir doses and survival time (figure 2G).

The final diagnosis was performed by immunohistochemical study in eight dogs after necropsy (two dogs were not available for necropsy). All tumors were diagnosed as high-grade gliomas: 6 of them were grade III oligodendrogliomas and two were GBM (grade IV astrocytomas) (table 1 and online supplemental figure S4).

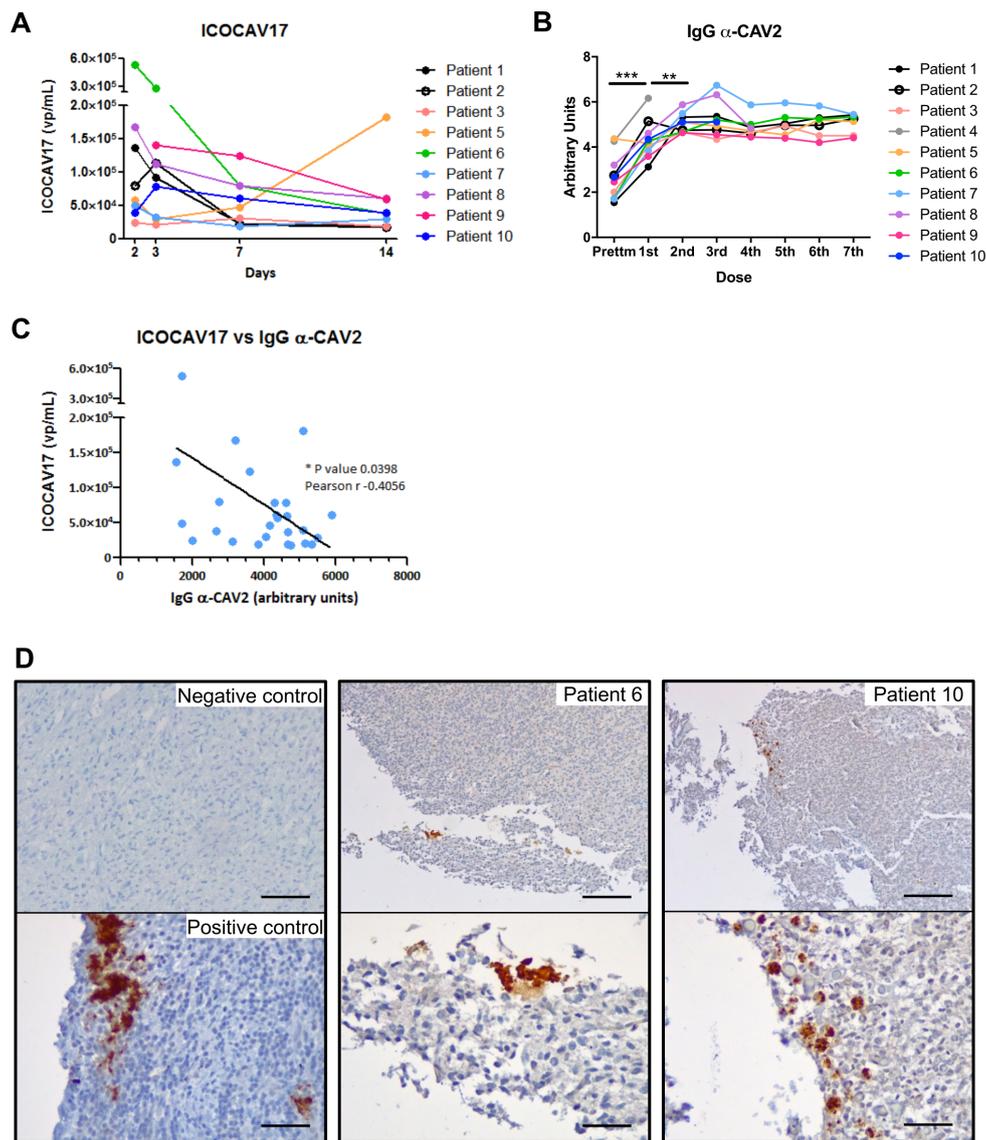


**Figure 2** Tumor growth and survival time from the dCelyvir-treated patients. (A) Waterfall plot showing changes in tumor size. Tumor growth from baseline (first MRI) to 2 months after starting the dCelyvir treatment (second MRI) is shown for each patient. (B) Survival time. Bar plot showing the total survival time for each patient. The days from symptom onset to diagnosis, from diagnosis to starting dCelyvir treatment, and from treatment to death are indicated for each patient. (C) Survival analysis. Kaplan-Meier curve showing the probability of survival for dCelyvir-treated dogs (blue line) starting with day of treatment up to death. The dashed red line indicates the MST according to the literature and the historical cases treated with resective surgery. (D–G) Correlation analysis between survival time and tumor size at first MRI (D), at second MRI (E), tumor growth (F), and dCelyvir dose (G) calculated by Pearson's correlation coefficient ( $r$ ). Individual values (blue dots) and regression lines are shown. \*\* $p < 0.005$ . MST, median survival time; PD, progressive disease; PR, partial response; SD, stable disease.

### Virus and antiviral antibody detection

The oncolytic adenovirus ICOCV17 was detected in the blood of all of the treated dogs that were analyzed ( $n=9$ ) (figure 3A). Five of them showed the highest viral particles 2 days after the first treatment, showing a steady reduction until 14 days after the first treatment. Two dogs achieved the highest values on the third day after the first doses; the presence of the virus in the blood samples subsequently decreased. Lastly, patient 5 (the one with the longest time

since the last vaccination) showed the highest virus titer 7 days after the second dose (d14) (figure 3A and table 1); however, this dog presented a similar anti-CAV2 antibody titer to that of the other dogs that had been vaccinated more recently (figure 3B). Further, ICOCV17-positive cells were detected inside gliomas from necropsies in 3 dogs (1, 6, and 10) (figure 3D). All the treated dogs showed anti-CAV2 antibodies before the dCelyvir treatment, which increased gradually from the first dose; after

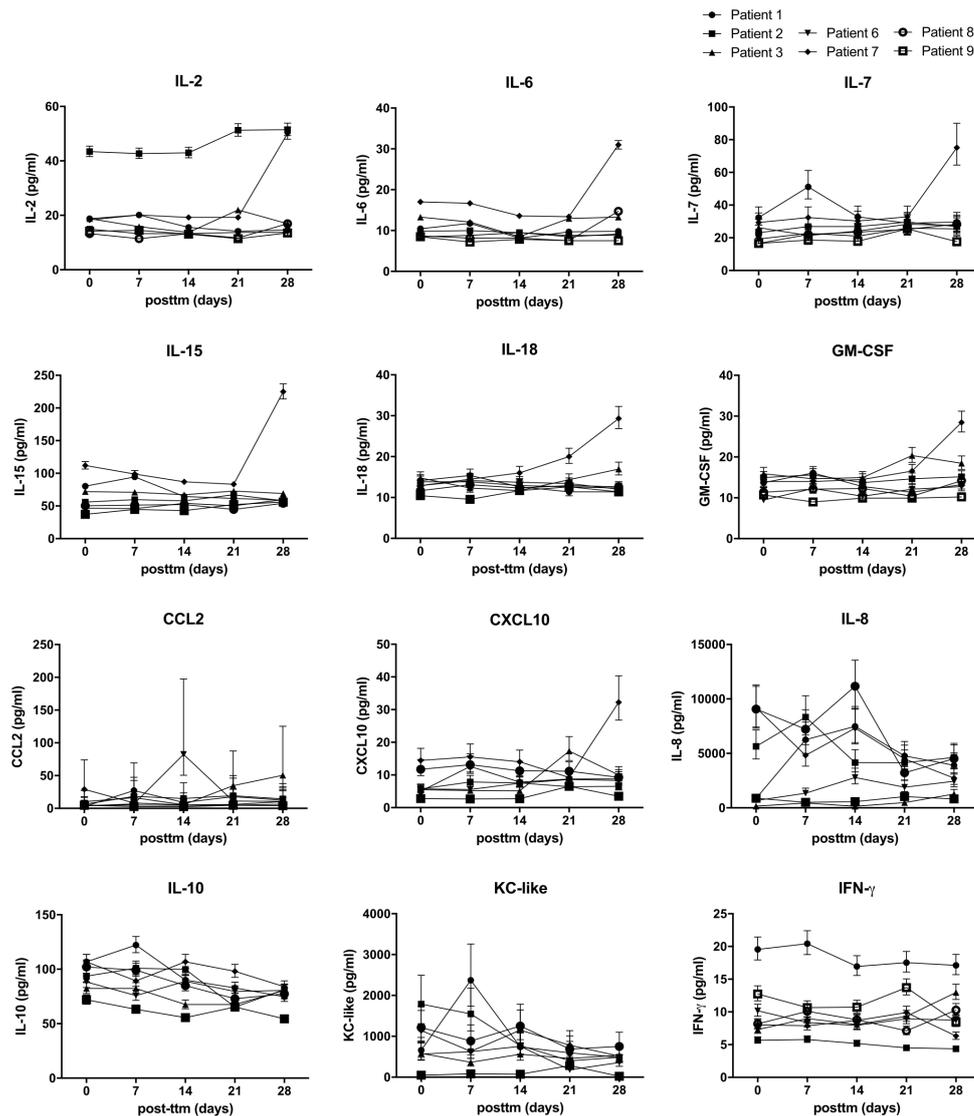


**Figure 3** Oncolytic virus and antibody response. (A) Adenovirus detection during follow-up. Adenovirus presence analyzed by quantitative PCR (qPCR) in peripheral blood is shown. Quantification time refers to the time after the first day of treatment (day 0). Individual values from each patient are shown. (B) Specific antibodies. IgG  $\alpha$ -CAV2 quantified by solid phase ELISA in the serum of canine patients during dCelyvir treatments. A Wilcoxon test was performed ( $***p < 0.0001$ ;  $**p < 0.005$ ). (C) Correlation between oncolytic adenovirus and specific antibodies was calculated by Pearson's correlation coefficient ( $r$ ), using data from all available dogs up to the second week of treatment (14th day after treatment). Individual values (blue dots) and a regression line are shown.  $*p < 0.05$ . (D) The presence of adenovirus inside gliomas analyzed by immunohistochemistry. Representative images showing adenovirus-positive cells (brown) on formalin-fixed, paraffin-embedded-positive control tissue, and tumor necropsies from patients 6 and 10. Scale bars: 50  $\mu$ m (negative and positive controls), 200  $\mu$ m (top patients) and 50  $\mu$ m (bottom patients).

the second dose they tended to stabilize over the following treatments (figure 3B). Although the dogs had similar antibody trend, they showed greater differences in viral particles detected in blood (figure 3A–B). There was a negative correlation ( $r = -0.4056$ ) between the ICOCaV17 particles in peripheral blood and the specific antibodies against CAV2 (figure 3C).

#### Immune response in peripheral blood

Cytokines in peripheral blood were quantified during the first 4 weeks by analysis with a multiplex cytokine panel to analyze whether the dCelyvir treatment could be modifying the dogs' cytokine secretion. No alterations in IL-2, IL-6, IL-7, IL-15, IL-18, GM-CSF, CCL2, or CXCL10 during the treatment were detected (figure 4). However, patient



**Figure 4** Cytokines in peripheral blood from treated patients quantified by a multiplex assay. Sera from treated dogs were analyzed prior to treatment (d0) and Weekly after the first four treatments (days 7, 14, 21, and 28) for IL-2, IL-6, IL-7, IL-15, IL-18, GM-CSF, CCL2, CXCL10, IL-8, IL-10, KC-like, and IFN- $\gamma$ . Individual values are shown. GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.

7 showed an increase in IL-2, IL6, IL-7, IL-15, IL-18, GM-CSF, and CXCL10 levels after 4 weekly doses. Patient 2 had the highest IL-2 quantification before starting and during the entire treatment. Immune cell populations in peripheral blood were quantified by flow cytometry to assess whether the dCelyvir treatment was affecting the normal function of the immune system, but no significant differences in neutrophil, T cell, macrophage, or natural killer cell counts were observed (data not shown).

#### Tumor-infiltrating immune cells

Immunohistochemistry was performed to investigate whether the dCelyvir treatment could induce changes in

tumor-infiltrating lymphocytes (TILs), which could not be detected in two grade III oligodendrogliomas (table 2). In the rest of the dogs, lymphocytic infiltrates were found around glomeruloid vessels forming perivascular cuffs or as scattered cells within the tumor (online supplemental figure S4). The most prominent lymphocytic population was CD3<sup>+</sup> TILs, in all tumors (mean of 36.05 cells/mm<sup>2</sup>) and increased considerably in GBM (118.2 cells/mm<sup>2</sup>) compared with grade III oligodendrogliomas (8.64 cells/mm<sup>2</sup>) (figure 5A and table 2). FOXP3<sup>+</sup> lymphocytes were detected in 25% (2/8) of the evaluated samples and were particularly severe in the GBM. A low number of CD20<sup>+</sup>

**Table 2** Inflammatory pattern and quantification of TILs

Patient	Inflammatory pattern	TILs (mean)		
		FOXP3+	CD3+	CD20+
1	None	0	0	0
2	None	0	0	0
3	Perivascular+intratumoral	0	28	2.4
5	Perivascular+intratumoral	0	4.8	1.6
6	Perivascular+intratumoral	17.6	226	27.2
7	Perivascular+intratumoral	0	10.4	1.6
8	Perivascular	0	12.8	0.8
10	Intratumoral	1.6	6.4	3.2

TILs, tumor-infiltrating lymphocytes.

cells was observed (mean of 4.6 cells/mm<sup>2</sup>). Patient 6 showed the highest number of CD20+ cells, as occurred with other evaluated lymphocytic populations (figure 5A and table 2).

To determine whether the intratumor immune micro-environment could be affected by the dCelyvir treatment, a CIBERSORT algorithm that estimated TIL composition from bulk RNA expression data was employed (figure 5B). The dogs with SD (2/5) and PR (1/5) presented a tendency for reduced memory B-cell infiltration and increased B-cell activation. Similarly, a tendency to increased monocyte/macrophage lineage infiltration was observed in the dogs with SD and PR (figure 5C). Interestingly, dogs with osteolytic lesions (3/4) also presented changes in TIL composition, with a significant reduction in memory B cells and a higher infiltration of the monocyte/macrophage lineage (figure 5D).

## DISCUSSION

In this study, 9/10 dogs were brachycephalic according to other reports that describe the predisposition of brachycephalic dog breeds to gliomas.<sup>20 24 26</sup> The median time from the onset of clinical symptoms to diagnosis (40 days) agreed with previously reported values, as did the imaging characteristics.<sup>27 35</sup> Therefore, our study population should be considered as a representative sample of spontaneous high-grade glioma in dogs.

The dCelyvir treatment was well tolerated, as we had previously reported with extracranial solid tumors.<sup>6</sup> Only minor adverse effects (limb swelling and fatigue) were sporadically observed and were self-limiting or required short-term anti-inflammatory treatment. There were no significant changes in the complete blood count, and biochemical parameters were stable within the referenced ranges. The finding of adenovirus inside the tumors is evidence that dMSCs are effective in delivering of ICOCV17 into gliomas; but due to the strong hepatotropism of Ads, ICOCV17 could have accumulated in the liver, as previously reported with dCelyvir treatment.<sup>6 36</sup> Despite the prevalence of microscopic lesions, especially previously reported chronic inflammatory responses in

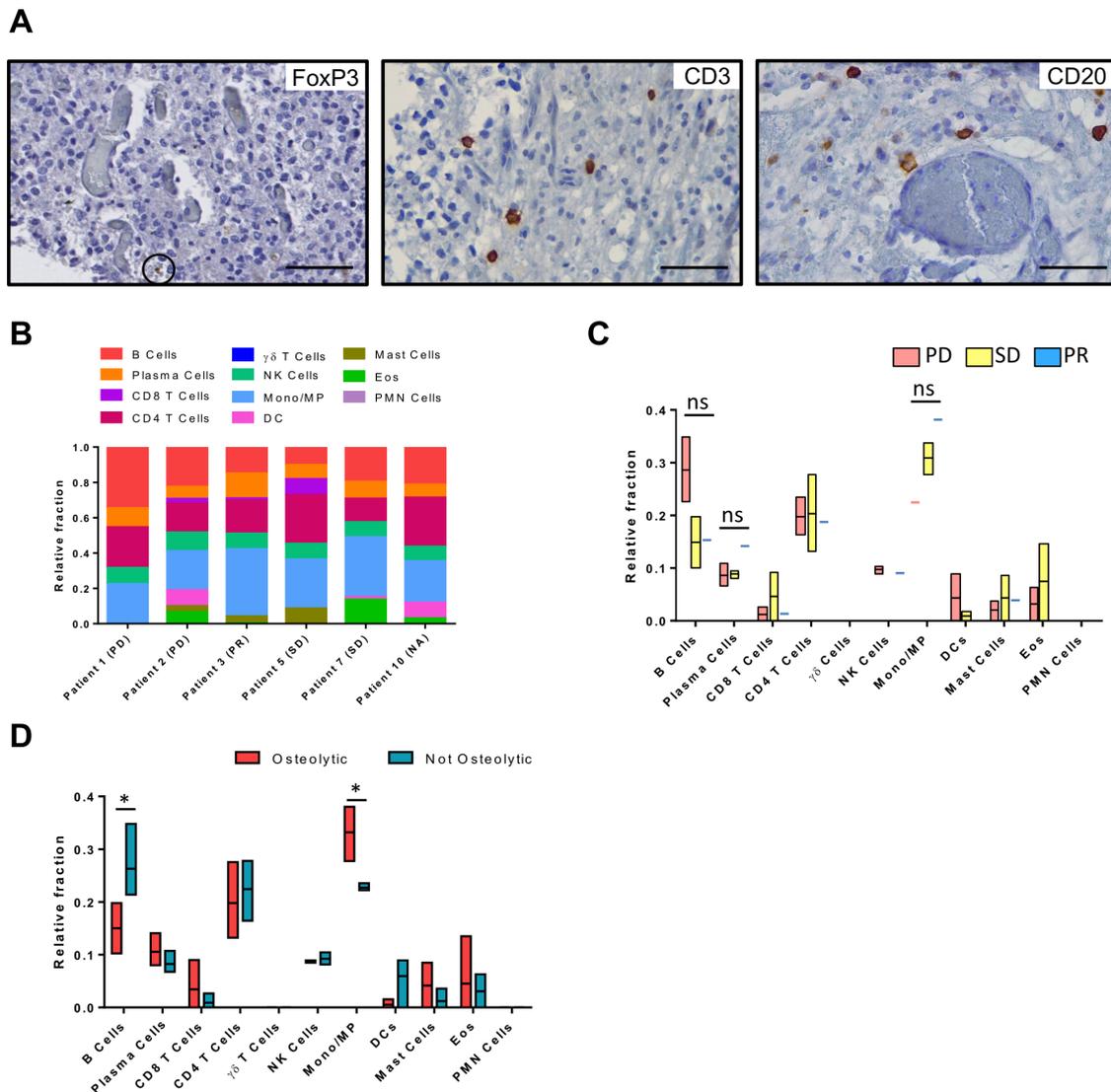
different organs, the use of dCelyvir did not demonstrate significant pathological changes or clinical signs in the livers of dogs presenting extracranial solid tumors.<sup>6 36</sup> Considering these findings with the biochemical abnormalities that patient 4 presented before the dCelyvir treatment, an undetected pre-existing liver disease (toxic hepatopathy secondary to phenobarbital and/or steroids, infectious hepatitis, or diffuse neoplasia) could be the cause of its clinical deterioration.

Radiation therapy has become the gold standard for treating canine high-grade glioma, with MSTs from 255 to 282 days; however, it is expensive and there are few hospitals that offer this therapy.<sup>26</sup> In dogs, lomustine has shown a benefit in MST from diagnosis when compared with palliative care (138 vs 35 days).<sup>37</sup> Interestingly, dCelyvir treatment shows a slight increase in MST from treatment (90 days) when compared with palliatively treated dogs (35 days)<sup>37</sup> or surgically treated dogs.<sup>38</sup> We have not found an association between MST and tumor volume or its localization; however, it is important to note that most of the patients presented large-sized tumors (>2 cm<sup>2</sup>).

Tumor size was increased after 2 months of treatment in 3 dogs (3/7) in which revision MRI was performed, which could be due to tumor cell proliferation and/or tumor pseudoprogression, the latter of which has been observed in humans with recurrent high-grade gliomas treated intratumorally with DNX-2401, a CRAd homologous to ICOCV17,<sup>12</sup> and in dogs with brain tumors treated with intrathecal Zika virus.<sup>39</sup> This phenomenon appeared soon after the start of treatment, followed by a progressive reduction in tumor size; however, the dogs' short survival time did not allow us to confirm that possibility in this study. Unfortunately, given that there are no consensus criteria for the analysis of immunotherapies in veterinary medicine, RAVNO criteria have been used even though they do not consider pseudoprogessions as do the immune-specific response criteria in human clinical practice, the Immune-related Response Evaluation Criteria in Solid Tumors and the Immune-related response criteria.

Severe skull bone resorption (calvarial erosion) was detected in 3 dogs (3/4) examined with CT soon before or after death. This event has been previously reported in dogs, although is an uncommon finding in humans with brain tumors.<sup>40 41</sup> The proposed mechanisms are direct invasion of tumor cells into the skull, tumor pressure on the inner table of the skull, and the destruction caused by proteolytic enzymes secreted by the tumor cells.<sup>41</sup> Calvarial erosion was found to be near the neoplasia but also distally and bilaterally (patients 3 and 7). There is the clinical impression that skull bone resorption in dogs with long-standing gliomas is much more frequent than that reported to date in the veterinary literature.

EIA-mutant human Ads demonstrated potent cytolytic effects in human gliomas<sup>42 43</sup> and canine Ads in extracranial solid tumors, either administered intratumorally<sup>13 18</sup> or carried by dMSCs, with higher clinical benefit.<sup>6</sup> Although dCelyvir has been reported to reach an extracranial solid



**Figure 5** Intratumor immune microenvironment characterization after dCelyvir treatment. (A) The presence of immune cells inside gliomas analyzed by immunohistochemistry. Representative images showing immune cells (brown) on formalin-fixed, paraffin-embedded tumors at necropsies. Scale bars: 50  $\mu$ m. (B) Relative fraction of 11 types of TILs in 6 dogs estimated with CIBERSORT. (C) Immune cell relative fraction from patients depending on their clinical benefit, after dCelyvir treatment. (D) Immune cell relative fraction from patients, comparing those that present an osteolytic pattern at CT imaging (osteolytic) and those that do not (not osteolytic). Statistic test: Two-way ANOVA and Bonferroni's multiple comparison test; Alpha: 0.05; ns: not significant; \* $p < 0.05$ . ANOVA, analysis of variance; DC, dendritic cells; Eos, Eosinophils; Mono/MP, Monocyte/Macrophages; PD, progressive disease; PMN, polymorphonuclear cells; PR, partial response; SD, stable disease; TILs, tumor-infiltrating lymphocytes.

tumor in a canine patient,<sup>44</sup> this is the first time that systemically administered viral treatment has been shown to effectively reach the brain tumor and show biological activity, a fact of vital importance for the efficacy of the therapy. Despite that, the limited efficacy of dCelyvir in treating high-grade gliomas could have been due to (1) the specific characteristics of the immune system in the CNS; (2) the fact that the viral load reaching the tumor was reduced by the blood-brain barrier; (3) due to the MSC sequestration in the lungs

(or other organs); or (4) by the large tumor size at the time of inclusion in the study.<sup>45,46</sup>

All dogs presented an increase in IgG  $\alpha$ -CAV-2 until reaching a plateau after the second dCelyvir dose, in agreement with previous studies.<sup>6,13</sup> The increase of the antibody levels did not preclude a clinical benefit in this study; there was a correlation between antiviral antibodies and ICOCV17 particles, suggesting that a lower concentration of antibodies could reduce the number of neutralized viral



particles, thereby allowing a higher oncolytic viral load. The use of an OV, against which the dogs have not been previously vaccinated, should be considered in the future to favor dCelyvir effectiveness.

The absent systemic inflammatory response observed in the cytokine profile in most of the dogs could indicate that ICOCV17 did not elicit an exaggerated systemic response, in contrast to other intrathecally injected viruses that increased IL-8, keratinocyte chemoattractant (KC)-like, and CCL2 in the serum of dogs with malignant intracranial tumors.<sup>39</sup> However, the intratumoral immune cells analysis of our treatment suggested that changes in TILs could be relevant in treatment response. The glioma composition of TILs in our treated dogs was according to that reported in non-treated dogs with gliomas, consisting in higher population of CD3+ and FoxP3+, compared with CD20+ TILs. Also, the number of TILs were increased in GBM compared with lower grade gliomas.<sup>19</sup> However, dogs showing a clinical benefit such as SD or PR present a tendency for reduced memory B-cell infiltration and increased activated B cells and monocyte/macrophage-lineage cells infiltrated. It has now been proven that the tumor-infiltrating T lymphocytes play a critical role in controlling or promoting tumor growth, but the function of B lymphocytes is less clear, although recent data have indicated a critical role for tumor-infiltrating B-cells in immunotherapies.<sup>47</sup> Changes in TIL populations have also been observed in dogs with osteolytic lesions. However, osteoclasts can have a monocytic-macrophagic derivation,<sup>48-50</sup> and dogs presenting an osteolytic pattern showed an increased relative fraction of this lineage. Thus, further studies should be performed to clarify these relationships.

In this study, dMSCs infected with a canine OV to treat high-grade gliomas in dogs were used without significant toxicities or adverse reactions. The increased MST compared with previous reports describing the prognosis of palliative treatment or surgery makes dCelyvir a candidate for combination therapy with surgery or different administration routes. These findings could be relevant for clinical trials being developed in humans, which are similar to this study, such as the phase Ib clinical trial using this cellular virotherapy in children, adolescents, and young adults with diffuse intrinsic pontine glioma (EudraCT 2020-004838-37) and the trial with the oncolytic adenovirus DNX-2401 in patients with recurrent high-grade glioma (NCT03896568). The reported data using dogs as a preclinical model could serve as a transition in the therapeutic development of human medicine and can potentially improve the success of subsequent clinical trials.

#### Author affiliations

<sup>1</sup>Servicio de Neurología, Hospital Clínico Veterinario, Universidad Alfonso X el Sabio, Villanueva de la Cañada, Spain

<sup>2</sup>Servicio de Neurología, Hospital Veterinario VETSIA, Leganés, Spain

<sup>3</sup>Unidad de Biotecnología Celular, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>4</sup>Molecular Genetics of Angiogenesis Group, Spanish National Centre for Cardiovascular Research (CNIC), Madrid, Spain

<sup>5</sup>Unitat de Patologia Murina i Comparada (UPMiC), Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Facultat de Veterinària, Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>6</sup>IDIBELL, Institut Català d'Oncologia, Barcelona, Spain

<sup>7</sup>Unidad de Investigación Biomédica (UIB-UAX), Universidad Alfonso X el Sabio, Villanueva de la Cañada, Spain

**Twitter** Stefano Gambera @GamberaStefano and Javier García-Castro @JavierGC280

**Acknowledgements** The authors would like to thank Miguel Ángel Rodríguez-Milla, Isabel Cubillo and Alvaro Morales from Unidad de Biotecnología Celular, Instituto de Salud Carlos III for their technical support in the study. The authors would also like to thank Dolors Pi, Ester Blasco and Tamara Rivero from Unitat de Patologia Murina i Comparada (UPMiC) at Universitat Autònoma de Barcelona, and for their technical support with the diagnosis and immunohistochemistry. The authors would also like to thank Pablo Delgado-Bonet from Universidad Alfonso X el Sabio for his help with the IHC images. The graphical abstract and figure 1 have been designed using images from Freepik.com, which have free license.

**Contributors** Conception and design: JG-C and AJP-B; Development of tools and methodology: AC, IM, RA, and AJP-B; Acquisition of data (provided animals, managed patients, diagnosis and provided facilities): AC, IM, MP, JG-C; Analysis and interpretation of data (imaging, statistical analysis and computational analysis): IM, SG, MP, JG-C and AJP-B; Writing the paper: AC, IM, SG and AJP-B; Review the paper: AC, IM, SG, MP, RA, JG-C and AJP-B. Guarantor: JG-C

**Funding** This work was funded by Instituto de Salud Carlos III (PI14CIII/00005 and PI17CIII/00013 grants to JG-C), Consejería de Educación, Juventud y Deporte de Comunidad de Madrid (P2017/BMD-3692 grant to JG-C), the Madrid Regional Government (CellCAM; P2010/BMD-2420 to JG-C), the Asociación Pablo Ugarte, and the Asociación AFANION. This work was also supported by Universidad Alfonso X el Sabio and Santander Universidades-Fundación Universidad Alfonso X el Sabio (1010909 grant to AJP-B).

**Competing interests** None declared.

**Patient consent for publication** Not applicable.

**Provenance and peer review** Not commissioned; externally peer reviewed.

**Data availability statement** All data relevant to the study are included in the article or uploaded online as supplemental information. Not applicable.

**Supplemental material** This content has been supplied by the author(s). It has not been vetted by BMJ Publishing Group Limited (BMJ) and may not have been peer-reviewed. Any opinions or recommendations discussed are solely those of the author(s) and are not endorsed by BMJ. BMJ disclaims all liability and responsibility arising from any reliance placed on the content. Where the content includes any translated material, BMJ does not warrant the accuracy and reliability of the translations (including but not limited to local regulations, clinical guidelines, terminology, drug names and drug dosages), and is not responsible for any error and/or omissions arising from translation and adaptation or otherwise.

**Open access** This is an open access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited, appropriate credit is given, any changes made indicated, and the use is non-commercial. See <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

#### ORCID iDs

Ana Cloquell <http://orcid.org/0000-0002-1400-6134>

Isidro Mateo <http://orcid.org/0000-0002-2667-9459>

Stefano Gambera <http://orcid.org/0000-0003-2998-8502>

Javier García-Castro <http://orcid.org/0000-0001-7604-1640>

Ana Judith Perisé-Barrios <http://orcid.org/0000-0002-0136-3968>

#### REFERENCES

- 1 Sánchez D, Cesarman-Maus G, Amador-Molina A, et al. Oncolytic viruses for canine cancer treatment. *Cancers* 2018;10:404.
- 2 Russell L, Peng KW, Russell SJ, et al. Oncolytic viruses: priming time for cancer immunotherapy. *BioDrugs* 2019;33:485-501.
- 3 Tähtinen S, Grönberg-Vähä-Koskela S, Lumen D, et al. Adenovirus improves the efficacy of adoptive T-cell therapy by recruiting immune cells to and promoting their activity at the tumor. *Cancer Immunol Res* 2015;3:915-25.
- 4 Woller N, Gürlevik E, Fleischmann-Mundt B, et al. Viral infection of tumors overcomes resistance to PD-1-immunotherapy by

- broadening Neoantigenome-directed T-cell responses. *Mol Ther* 2015;23:1630–40.
- 5 Raja J, Ludwig JM, Gettinger SN, *et al.* Oncolytic virus immunotherapy: future prospects for oncology. *J Immunother Cancer* 2018;6:140.
  - 6 Cejalvo T, Perisé-Barrios AJ, Del Portillo I, *et al.* Remission of spontaneous canine tumors after systemic cellular viroimmunotherapy. *Cancer Res* 2018;78:4891–901.
  - 7 Morales-Molina A, Rodríguez-Milla Miguel Ángel, Gimenez-Sanchez A, *et al.* Cellular Virotherapy Increases Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TIL) and Decreases their PD-1<sup>+</sup> Subsets in Mouse Immunocompetent Models. *Cancers* 2020;12:1920. doi:10.3390/cancers12071920
  - 8 Guedan S, Rojas JJ, Gros A, *et al.* Hyaluronidase expression by an oncolytic adenovirus enhances its intratumoral spread and suppresses tumor growth. *Mol Ther* 2010;18:1275–83.
  - 9 Ulasov IV, Borovjagin AV, Schroeder BA, *et al.* Oncolytic adenoviruses: a thorny path to glioma cure. *Genes Dis* 2014;1:214–26.
  - 10 Kiyokawa J, Wakimoto H. Preclinical and clinical development of oncolytic adenovirus for the treatment of malignant glioma. *Oncolytic Virother* 2019;8:27–37.
  - 11 Bush NAO, Chang SM, Berger MS. Current and future strategies for treatment of glioma. *Neurosurg Rev* 2017;40:1–14.
  - 12 Lang FF, Conrad C, Gomez-Manzano C, *et al.* Phase I study of DNx-2401 (Delta-24-RGD) oncolytic adenovirus: replication and immunotherapeutic effects in recurrent malignant glioma. *J Clin Oncol* 2018;36:1419–27.
  - 13 Martín-Carrasco C, Delgado-Bonet P, Tomeo-Martín BD, *et al.* Safety and efficacy of an oncolytic adenovirus as an immunotherapy for canine cancer patients. *Vet Sci* 2022;9:327. doi:10.3390/vetsci9070327
  - 14 Gállego Pérez-Larraya J, Garcia-Moure M, Labiano S, *et al.* Oncolytic DNx-2401 virus for pediatric diffuse intrinsic pontine glioma. *N Engl J Med* 2022;386:2471–81.
  - 15 Ferguson MS, Lemoine NR, Wang Y. Systemic delivery of oncolytic viruses: hopes and hurdles. *Adv Virol* 2012;2012:1–14.
  - 16 García-Castro J, Alemany R, Cascalló M, *et al.* Treatment of metastatic neuroblastoma with systemic oncolytic virotherapy delivered by autologous mesenchymal stem cells: an exploratory study. *Cancer Gene Ther* 2010;17:476–83.
  - 17 Ruano D, López-Martín JA, Moreno L, *et al.* First-In-Human, First-in-Child trial of autologous MscS carrying the oncolytic virus Icovir-5 in patients with advanced tumors. *Mol Ther* 2020;28:1033–42.
  - 18 Laborda E, Puig-Saus C, Rodríguez-García A, *et al.* A pRb-responsive, RGD-modified, and hyaluronidase-armed canine oncolytic adenovirus for application in veterinary oncology. *Mol Ther* 2014;22:986–98.
  - 19 Amin SB, Anderson KJ, Boudreau CE, *et al.* Comparative molecular life history of spontaneous canine and human gliomas. *Cancer Cell* 2020;37:243–57.
  - 20 José-López R, Gutierrez-Quintana R, de la Fuente C, *et al.* Clinical features, diagnosis, and survival analysis of dogs with glioma. *J Vet Intern Med* 2021;35:1902–17.
  - 21 Delgado-Bonet P, Tomeo-Martín BD, Delgado-Bonet B, *et al.* Intracranial virotherapy for a canine hemangioma. *Int J Mol Sci* 2022;23:11677. doi:10.3390/ijms231911677
  - 22 Connolly NP, Shetty AC, Stokum JA, *et al.* Cross-species transcriptional analysis reveals conserved and host-specific neoplastic processes in mammalian glioma. *Sci Rep* 2018;8:1180.
  - 23 Boudreau CE, York D, Higgins RJ, *et al.* Molecular signalling pathways in canine gliomas. *Vet Comp Oncol* 2017;15:133–50.
  - 24 Song RB, Vite CH, Bradley CW, *et al.* Postmortem evaluation of 435 cases of intracranial neoplasia in dogs and relationship of neoplasm with breed, age, and body weight. *J Vet Intern Med* 2013;27:1143–52.
  - 25 LeBlanc AK, Mazcko CN. Improving human cancer therapy through the evaluation of pet dogs. *Nat Rev Cancer* 2020;20:727–42.
  - 26 Dickinson PJ. Advances in diagnostic and treatment modalities for intracranial tumors. *J Vet Intern Med* 2014;28:1165–85.
  - 27 Debreyue M, De Fornel P, David I, *et al.* Definitive-intent uniform megavoltage fractionated radiotherapy protocol for presumed canine intracranial gliomas: retrospective analysis of survival and prognostic factors in 38 cases (2013–2019). *BMC Vet Res* 2020;16:412.
  - 28 Koehler JW, Miller AD, Miller CR, *et al.* A revised diagnostic classification of canine glioma: towards validation of the canine glioma patient as a naturally occurring preclinical model for human glioma. *J Neuropathol Exp Neurol* 2018;77:1039–54.
  - 29 MacNeill AL. On the potential of oncolytic virotherapy for the treatment of canine cancers. *Oncolytic Virother* 2015;4:95–107.
  - 30 Alonso-Miguel D, Valdivia G, Guerrero D, *et al.* Neoadjuvant in situ vaccination with cowpea mosaic virus as a novel therapy against canine inflammatory mammary cancer. *J Immunother Cancer* 2022;10.
  - 31 Rossmeisl JH, Garcia PA, Daniel GB, *et al.* Invited review--neuroimaging response assessment criteria for brain tumors in veterinary patients. *Vet Radiol Ultrasound* 2014;55:115.
  - 32 Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007;114:97–109.
  - 33 Higgins RJ, Bollen AW, Dickinson PJ. Tumors of the nervous system. *Tumors in Domestic Animals* 2016:834–91.
  - 34 Chen B, Khodadoust MS, Liu CL, *et al.* Profiling tumor infiltrating immune cells with CIBERSORT. *Methods Mol Biol* 2018;1711:243–59.
  - 35 Kishimoto TE, Uchida K, Chambers JK, *et al.* A retrospective survey on canine intracranial tumors between 2007 and 2017. *J Vet Med Sci* 2020;82:77–83.
  - 36 Gómez A, Sardón D, Cejalvo T, *et al.* Biodistribution analysis of oncolytic adenoviruses in canine patient necropsy samples treated with cellular virotherapy. *Mol Ther Oncolytics* 2020;18:525–34.
  - 37 Moirano SJ, Dewey CW, Wright KZ, *et al.* Survival times in dogs with presumptive intracranial gliomas treated with oral lomustine: a comparative retrospective study (2008–2017). *Vet Comp Oncol* 2018;16:459–66.
  - 38 Suñol A, Mascort J, Font C, *et al.* Long-term follow-up of surgical resection alone for primary intracranial rostral tentorial tumors in dogs: 29 cases (2002–2013). *Open Vet J* 2017;7:375–83.
  - 39 Kaid C, Madi RADS, Astray R, *et al.* Safety, tumor reduction, and clinical impact of Zika virus injection in dogs with advanced-stage brain tumors. *Mol Ther* 2020;28:1276–86.
  - 40 Cunningham DA, Lowe LH, Shao L, *et al.* Neuroradiologic characteristics of astroblastoma and systematic review of the literature: 2 new cases and 125 cases reported in 59 publications. *Pediatr Radiol* 2016;46:1301–8.
  - 41 Recio A, de la Fuente C, Pumarola M, *et al.* Magnetic resonance imaging and computed tomographic characteristics of a glioma causing calvarial erosion in a dog. *Vet Radiol Ultrasound* 2019;60:E1–5.
  - 42 Fueyo J, Gomez-Manzano C, Alemany R, *et al.* A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene* 2000;19:2–12.
  - 43 Alonso MM, Cascallo M, Gomez-Manzano C, *et al.* ICOVIR-5 shows E2F1 addiction and potent antiglioma effect in vivo. *Cancer Res* 2007;67:8255–63.
  - 44 Delgado-Bonet P, Tomeo-Martín BD, Ortiz-Díez G, *et al.* Tumor-homing of mesenchymal stem cells infected with oncolytic virus in a canine patient. *Vet Sci* 2022;9:285.
  - 45 Abdi Z, Eskandary H, Nematollahi-Mahani SN. Effects of two types of human cells on outgrowth of human glioma in rats. *Turk Neurosurg* 2018;28:19–28.
  - 46 Conaty P, Sherman LS, Naaldijk Y, *et al.* Methods of mesenchymal stem cell homing to the blood-brain barrier. *Methods Mol Biol* 2018;1842:81–91.
  - 47 Downs-Canner SM, Meier J, Vincent BG, *et al.* B cell function in the tumor microenvironment. *Annu Rev Immunol* 2022;40:169–93.
  - 48 Madel M-B, Ibáñez L, Wakkach A, *et al.* Immune function and diversity of osteoclasts in normal and pathological conditions. *Front Immunol* 2019;10:1408.
  - 49 Keller A, Zarb Y. Reply: osteoclast imbalance in primary familial brain calcification: evidence for its role in brain calcification. *Brain* 2020;143:e2.
  - 50 Zarb Y, Weber-Stadlbauer U, Kirschenbaum D, *et al.* Ossified blood vessels in primary familial brain calcification elicit a neurotoxic astrocyte response. *Brain* 2019;142:885–902.

