



Universidad de Navarra

Facultad de Ciencias

*Viroinmunoterapia para el tumor rabdoide/
teratoide atípico (AT/RT): caracterización del
efecto antitumoral del adenovirus Delta-24-RGD*

MARISOL GONZÁLEZ HUARRIZ

Pamplona, 2021



Universidad de Navarra

Facultad de Ciencias

Viroinmunoterapia para el tumor rabdoide/
teratoide atípico (AT/RT): caracterización del
efecto antitumoral del adenovirus Delta-24-RGD

Memoria presentada por D^a Marisol González Huarriz para aspirar al Grado de
Doctor por la Universidad de Navarra

El presente trabajo ha sido realizado bajo la dirección y codirección en el Departamento de
Pediatría de la Clínica Universidad de Navarra y el Programa de Tumores Sólidos del
CIMA, autorizamos su presentación ante el Tribunal que lo ha de juzgar.

Pamplona, 29 de marzo 2021

Dra. Marta Alonso Roldán

Dr. Marc García Moure

Cuando das este paso a los 50 años tienes mucho que agradecer, muchas personas, llevas mucha trayectoria...y seguro que no acierto a dedicar unas palabras a todas las personas que me gustaría. Lo importante es que me siento tan querida....¿qué más puedo pedir? Gracias a todos.

Gracias a mis hijos, Marcos y Erik. Son el pilar de mi vida, y sin ellos no quiero ni pensar lo que hubiera sido de mí. Son mi amor y mi aliciente en la vida. Gracias hijos por tener paciencia conmigo durante estos meses tan duros. Sois geniales y os quiero como a nadie, ya lo sabéis.

Gracias a mi papi. A pesar de quedarse solo con 4 hijos adolescentes (yo con 17 años y recalcar que yo era un horror), siempre confió en mí y me apoyo, y eso que en el cole le dijeron que no servía para estudiar, ¿te acuerdas papi? Te quiero mucho. Gracias.

Gracias a Ricardo. Siempre ha creído en mí. Me ha impulsado y animado a dar este paso. Gracias a sus hijos, especialmente Irune, mi niña. Te quiero cielo.

Gracias a Marta, mi jefa, la persona que definitivamente me ha lanzado a este proyecto. Porque ha creído en mi capacidad y me ha ayudado a desarrollarme, hasta el punto de acabar aquí. A la gran amistad que nos une, nuestras penas y alegrías compartidas. Que grande eres Marta. Gracias por estar SIEMPRE ahí. GRACIAS MARTA.

Anica, tantos años juntas, que no revueltas hasta hace pocos años. Un placer y sabes que esta amistad es para siempre. Gracias de corazón.

Marc, mi jefote. Desde que llegó al labo conectamos. Nos llevamos muy bien, aunque a veces surgen chispas, je,je. Tenemos una gran amistad. Gracias por escuchar mis problemas y mis penas. Mi codirector de tesis..... estoy encantada. Tan preparado para todo.....Gracias Marcccc.

Me fascina mi trabajo. No me cuesta ir a trabajar, todo un lujo. Tengo unos compañeros estupendos. Luci, la alegría y ánimo personificado, Marta, la positividad, una mujer increíble. Los chiquitos, mi alegría y mi desahogo, porque les grito como a mis hijos. He compartido trabajo con muchos chavales, difícil nombrar a todos, pero durante mi tesis siempre me han ayudado y apoyado Naiara, Virginia, Iker, Dani y mi querida Mons. Mi chiquilla. Gracias Mons por aparecer en mi vida, eres un amor.

Sara, el último fichaje, y que bueno¡¡¡ SIEMPRE ayudando a todos, aunque te mareemos! Un placer compartir el trabajo contigo.

Inesi, mi compañera del alma. ¿Hay persona más buena en el mundo? Lo dudo. Gracias por nuestros momenticos, todavía nos quedan muchos.

Helen, mi amiga y gran apoyo en todo. Muchos años de conversaciones e intimidades. Un pilar en mi vida. Gracias Helen, te quiero mucho.

Gracias a Marisol Ripa, un apoyo total en todo. En lo profesional y en lo personal. Gracias.

Gracias al laboratorio de UA, con los que tanto he compartido. Mario, María, Ash, Dani, Bea y Fernando.

Quiero recordar a todas las personas que han pasado por mi vida profesional y he cogido un poquito de cada una: Jesus García Foncillas, Eva Bandrés, Susana Inoges, Dr.Leiva, Dr. Redondo ...Gracias a todos.

Gracias PALC, ya saben los que son. Mi cuadrilla es lo más grande que tengo. Con gente como ellos puedes hacer y superar cualquier cosa. Ya hay una doctora en la cuadrilla, quién lo iba a decir...Os quiero muchiiiiisimo.

Gracias a Las Grecas, Patricia y Ofelia. Que haría yo sin mis supervecinas. Menos mal que estáis en mi vida. Os quiero.

Gracias al Petit Comité, que grupo más bonito: Esther, Marta, Maite y Magui Cugui.. Después de 25 años y a pesar de ya no nos encontrarnos en el mismo lugar de trabajo, nos seguimos juntando y, sobretodo, disfrutando como si fuera el primer día.

Gracias a mis hermanos, Iñaki, Tito y Mikel. Siempre tan unidos para todo.

Gracias a Josune. Siempre ofreciéndome su ayuda a pesar de estar más liada que yo. Gracias cuña.

Y, cómo no, recordar a mi **mami**. Tal igual a mí. Cuando te fuiste, no estaba en mi mejor momento, era muy joven y bastante alocada. Sólo espero que veas lo que he conseguido. El camino recorrido en mi vida no ha sido nada fácil, como el tuyo, pero nuestra alegría puede con todo. Te echo mucho de menos....

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	17
INTRODUCCIÓN.....	25
1. TUMORES CEREBRALES PEDIÁTRICOS	25
2. TUMORES EMBRIONARIOS PEDIÁTRICOS.....	26
3. TUMOR RABDOIDE TERATOIDE ATÍPICO: AT/RT	29
3.1 Introducción y epidemiología de los AT/RT.....	29
3.2 Presentación clínica de los ATRT	30
3.3 Características histológicas de los AT/RT.....	31
3.4 Características genéticas y moleculares de los AT/RT	32
4. VIROTERAPIA	40
4.1 Introducción.....	40
4.2 Viroterapia en tumores cerebrales	42
4.3 Viroterapia en AT/RT.....	43
5. ADENOVIRUS	44
5.1 Estructura y genoma del adenovirus 5 (Ad5)	44
5.2 Ciclo de replicación viral.....	46
6. ADENOVIRUS ONCOLÍTICOS	47
6.1 Estrategias para condicionar la replicación del adenovirus.....	47
6.2 Estrategias para modificar el tropismo del adenovirus.....	49
6.3 Delta-24-RGD	49
HIPÓTESIS	53
OBJETIVOS	53
MATERIAL Y MÉTODOS	57
1. ESTUDIOS IN VITRO	57
1.2 Amplificación del virus	57

1.3 Caracterización de la expresión de SMARCB1	58
1.3.1 Extracción y medición de proteínas celulares	58
1.3.2 Western blot.....	58
1.4 Análisis de aberraciones genéticas	59
1.5 Análisis de receptores virales en las líneas celulares	59
1.6 Análisis de la infectividad por citometría de flujo	60
1.7 Medición de la actividad del factor de transcripción E2F1	61
1.8 Detección de proteínas virales	61
1.9 Replicación viral.....	61
1.10 Efecto oncolítico del virus	62
1.11 Estudio de muerte inmunogénica	63
1.11.1 Preparación de las muestras para detección de Hsp90, HMGB1 y ATP. 63	
1.11.2 ELISA de Hsp90 y HMGB1	63
1.11.3 Medición de ATP	63
1.11.4 Detección de calreticulina en membrana.....	64
1.12 Establecimiento de la línea celular BT-12 con Luc/GFP	64
1.13 Estudio anatomopatológico	65
1.13.1 Inmunohistoquímica	65
1.13.2 Inmunofluorescencia Multiplex.....	66
1.13.3 Imágenes de tejidos, deconvolución espectral y fenotipado.....	66
1.14 Fenotipado de linfocitos T.....	67
2. ESTUDIOS IN VIVO.....	68
2.1 Sistema de “guide-screw”.....	68
2.1.1 Implantación del bolt	69
2.1.2 Implantación de células y Delta-24-RGD	69
2.2 Generación de modelos in vivo	70
2.2.1 Modelo supratentorial.....	70

2.2.2 Modelo infratentorial.....	71
2.2.3 Modelo diseminado	71
2.3 Experimentos de supervivencia en modelos inmunodeprimidos	71
2.3.1 Modelo supratentorial.....	72
2.3.2 Modelo infratentorial.....	72
2.3.3 Modelo diseminado	72
2.4 Experimentos de supervivencia en modelos inmunocompetentes	72
3. ESTADÍSTICA	73
RESULTADOS.....	77
1. CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE LOS MODELOS DE AT/RT	77
2. LAS LÍNEAS ESTABLES DE AT/RT SON SUSCEPTIBLES A LA INFECCIÓN POR EL ADENOVIRUS DELTA-24-RGD.....	80
3. DELTA-24-RGD SE REPLICA Y EJERCE UN EFECTO ANTITUMORAL EN LÍNEAS DE AT/RT <i>IN VITRO</i>	83
4. EVALUACIÓN Y PUESTA A PUNTO DE LA CINÉTICA TUMORAL EN LOS MODELOS SUPRA E INFRATENTORIAL EN RATÓN.....	90
5. DELTA-24-RGD INCREMENTA SIGNIFICATIVAMENTE LA SUPERVIVENCIA EN MODELOS PRECLÍNICOS MURINOS DE AT/RT LOCALIZADO	91
7. EL VIRUS DELTA-24-RGD ES CAPAZ DE IMPEDIR EL DESARROLLO DE LESIONES DISEMINADAS EN MODELOS PRECLÍNICOS MURINOS	97
9. EL VIRUS DELTA-24-RGD INCREMENTA LA SUPERVIVENCIA EN UN MODELO INMUNOCOMPETENTE DE AT/RT	101
DISCUSIÓN.....	113
CONCLUSIONES	127
ANEXO.....	149

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

A

ACK	<i>Ammonium-Chloride-Potassium</i> ; Cloruro de amonio y potasio
Ad	Adenovirus
APC	<i>antigen-presenting cell</i> ; célula presentadora de antígeno
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
ARID1A	<i>AT-rich interactive domain-containing protein 1A</i>
ARID1B	<i>AT-rich interactive domain-containing protein 1B</i>
AT/RT	<i>Atypical teratoid/rhabdoid tumor</i> ; tumor rabdoide teratoide atípico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>

B

BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i> ; proteína morfogénica ósea
BRG1	<i>Brahma-related gene-1</i>

C

C19MC	<i>MicroRNA cluster on chromosome 19</i>
CAR	<i>Receptor Coxsackie-Adenovirus</i> ; Receptor Coxsackie-Adenovirus
CCG	Children's Cancer Group
CDDP	Cisplatino
CIMA	Centro de Investigación Biomédica
Cls	Células
CNS-PNET	<i>Central nervous system primitive neuroectodermal</i> ; tumor neuroectodérmico primitivo del sistema nervioso central
COG	<i>Children's Oncology Group Cell</i>
CPM	Ciclofosfamida

CRAds *Conditional replication adenovirus;* adenovirus replicativos condicionados

CRT Calreticulina

CTRUS *Central brain tumor registry of the United States;* Registro central de tumores cerebrales de Estados Unidos

CMV Citomegalovirus

CNVs *Copy Number Variation;* Variación del número de copias

CPM Cuentas por minuto

D

DAMPs *Damage-associated molecular patterns;* Patrones moleculares asociados a los daños

DAPI 4',6-diamidino-2-fenilindol

DB *DNA binding protein;* proteína de unión al DNA

DE Desviación estándar

DIPG *Diffuse intrinsic pontine glioma;* glioma pontino intrínseco difuso

DNA *Deoxyribonucleic acid;* ácido desoxirribonucleico

DNX-2401 Delta-24-RGD

E

ELISA *Enzyme-linked immunosorbent assay;* ensayo inmunoenzimático

EMA *Epithelial membrane antigen;* antígeno de la membrana epitelial

ETANTR *Embryonal tumor with abundant neuropil and true rosettes;* tumor embrionario con abundante neuropila y verdaderas rosetas

ETMR *Embryonal tumor with Multilayered Rosettes;* tumor embrionario con rosetas multicapas

EU-RHAB *European Rhaboid Registry;* registro europeo de raboides

F

FBS *Fetal Bovine Serum*; suero fetal de ternera
FDA *US Food and Drug Administration*; administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos

FITC *Fluorescein isothiocyanate*; isotiocianato de fluoresceína

G

GB Glioblastoma

G-CSF *Granulocyte colony-stimulating factor*; factor estimulante de colonias de granulocitos

GEM *Genetically engineered mouse*; ratón modificado genéticamente

GFAP *Glial fibrillary acidic protein*; proteína ácida glial fibrilar

GFP green fluorescent protein

GTR *Gross total resection*; resección total

H

HDAC *Histone deacetylase inhibitors*; inhibidores de la histona desacetilasa

HE Hematoxilina eosina

HG *High-grade glioma*; glioma de alto grado

HSV Herpes simplex virus

HuNSG Humanized nonobese diabetic (NOD). Cg-Prkdc^{sci d} IL2rg^{tm1Wjl}/Sz

I

IC Intervalo de confianza

IHC Immunohistoquímica

IGF1 *Insulin-like growth factor 1*; Factor de crecimiento similar a la insulina 1

IMDM *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*

INF- γ Interferon gamma

INI1 *INtegrase Interactor 1*

IR	<i>Ion Reporter</i> ;
IRSIII	<i>Intergroup Rhabdomyosarcoma Study III</i>
ITS	<i>Insulin Transferrin Selenius acid</i> ; insulina transferrina ácido selénico
ITT	<i>Intrathecal triple therapy</i> ; triple terapia intratecal
M	
MB	<i>Medulloblastoma</i> ; medulloblastoma
MCI	Muerte celular inmunogénica
MLP	<i>Major Late Promoter</i> ; promoter mayor tardío
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> ; multiplicidad de infección
MTS	[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
MV	<i>Measles virus</i> ; virus del sarampión
N	
Nabs	<i>Neutralizing antibodies</i> ; anticuerpos neutralizantes
NGS	<i>Next generation sequencing</i> ; secuenciación de nueva generación
O	
OMS	Organización mundial de la salud
OS	<i>Overall Survival</i> ; supervivencia global
P	
PES,	Etosulfato de fenazina
PBAF	<i>Polybromo associated BAF</i>
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i> ; bufer fosfato salino
PD-1	<i>Programed cell death protein</i>
PDX	<i>Patient-derived xenograft</i> ; Xenoinjerto derivado del paciente
PFU	<i>Plate forming unit</i> ; unidad formadora de placas

R

RB1	Retinoblastoma
RGD	Arginina-Glicina-Asparragina
RNA	Ácido ribonucleico

S

SCR	<i>Rescate con stem cell; stem cell rescue</i>
SDS	Docecil sulfato sódico
SEER	<i>Surveillance, Epimediology and End Results Program</i>
SHH	<i>Sonic hedgehog; Sonic hedgehog</i>
SLE	Supervivencia libre de enfermedad
SMA	<i>Smooth muscle actin</i>
SMARCA2	<i>SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator of Chromatin, Subfamily A, Member 2</i>
SMARCA4	<i>SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator of Chromatin, Subfamily A, Member 4</i>
SMARCB1	<i>SWI/SNF related, Matrix associated, Actin dependent Regular of Cromatin, subfamily B, member 1</i>
SMARCC1	<i>SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator of Chromatin, Subfamily C, Member 1</i>
SMARCC2	<i>SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator of Chromatin, Subfamily C, Member 2</i>
SNC	Sistema nervioso central
STR	<i>Subtotal resection; resección subtotal</i>
STR	<i>Short Tandem Repeat</i>
SWI/SNF	<i>SWItch/Sucrose Non Fermentable</i>

T

TAMO Transplante autólogo de médula ósea

TE Tumor Embrionario

TIL Linfocitos infiltrante tumor

TP *Terminal protein*; proteína terminal

TR Tumor rabdoide

T-VEC *Talimogene laherparepvec*

V

VCR Vincristina

VO Virus oncolítico

VP-16 Etopósido

vvDD *Double-deleted vaccinia virus*

W

WGA Wheat-germ agglutinin; Aglutinina de germen de trigo

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. TUMORES CEREBRALES PEDIÁTRICOS

El cáncer infantil, a pesar de ser una enfermedad rara, es la primera causa de muerte por enfermedad hasta los 14 años, siendo la segunda causa de muerte global en este periodo de edad, sólo superada por los accidentes, según el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (*Centers for Disease Control and Prevention*; CDC).

Los estudios epidemiológicos demuestran un incremento en el número de diagnósticos de cáncer infantil al año y, más del 40% de ellos, aparecen antes de los 5 años¹. Los tipos más frecuentes de cáncer en la infancia se dividen en dos grandes grupos: las enfermedades hematológicas (leucemias y linfomas) y los tumores sólidos. Las neoplasias más comunes son las leucemias, seguido de los tumores del sistema nervioso central (SNC) y los linfomas (**Figura 1**), aunque la distribución depende de la edad de los pacientes². Los tumores primarios del sistema nervioso central (SNC) constituyen los tumores sólidos más comunes, y la incidencia anual es de aproximadamente de 5,83 casos por 100.000 habitantes en niños con edades comprendidas entre los 0 y 14 años. No obstante, estos tumores suponen la principal causa de muerte por cáncer, con una mortalidad de 0,71 casos por cada 100.000 habitantes (datos relativos a la población de Estados Unidos, recogidos en el CBTRUS Statistical Report)³.

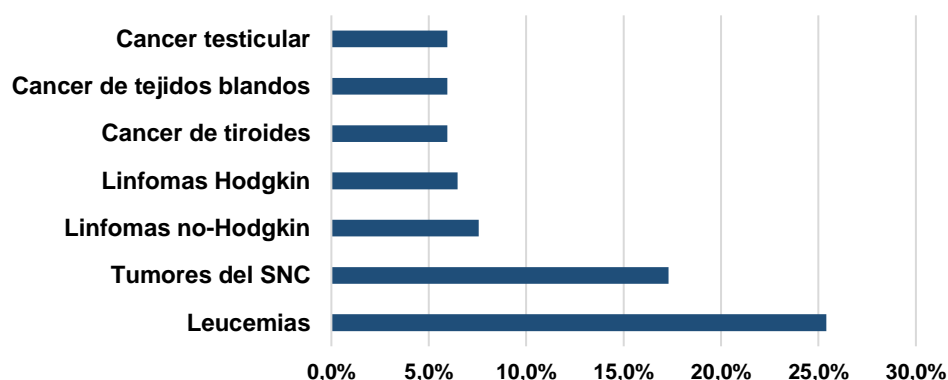


Figura 1. Distribución de cáncer infantil recogidos por SEER 21 (*Surveillance, Epidemiology and End Results Program*).

Dentro del grupo de los tumores del SNC pediátricos existe una gran diversidad. La clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2016 ha supuesto un gran cambio en cómo se clasifican estos tumores ya que contempla el uso de marcadores moleculares para la definición y diagnóstico de los tumores cerebrales⁴.

La distribución de los tumores de SNC por grupo histológico está claramente liderado por los gliomas en niños con edades comprendidas entre 0 y 14 años con un 62,9% de los casos (**Figura 2**), donde se incluyen diferentes grupos tumorales, como astrocitomas pilocíticos, glioblastomas, etc. La segunda entidad tumoral en frecuencia son los tumores embrionarios (TE) con un 12,7%³.

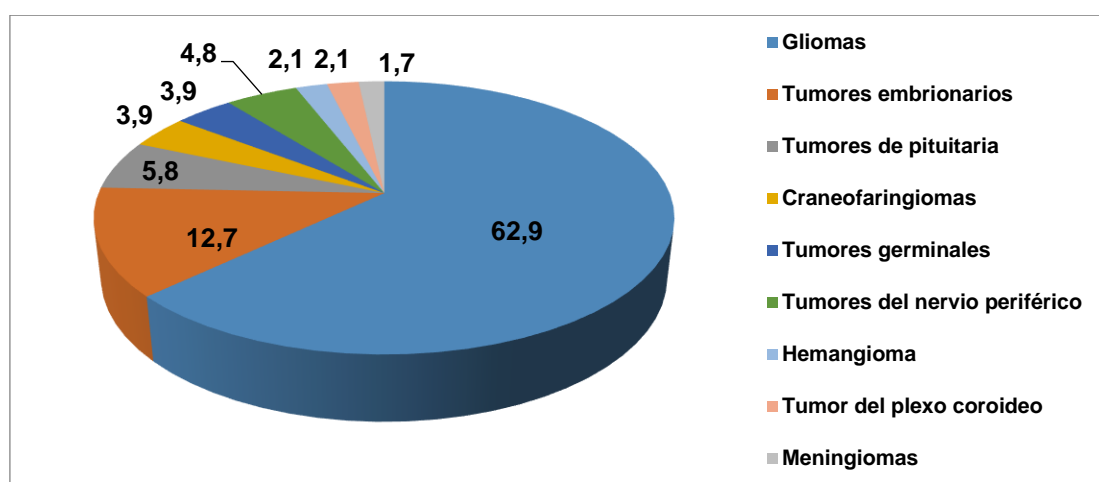


Figura 2. Distribución en porcentaje de los tumores de SCN por histología. Adaptación de Ostrom *et al.*, (*Neuro Oncology*, 2020³)

2. TUMORES EMBRIONARIOS PEDIÁTRICOS

Los tumores embrionarios (TE) del SNC en niños comprenden un amplio abanico de neoplasias malignas agresivas, todas ellas de grado IV de la OMS. Son neoplasias que se caracterizan por presentar una alta celularidad y actividad mitótica, compuesta por células pequeñas muy indiferenciadas⁵. Estos tumores no sólo invaden tejido nervioso, sino que son capaces de diseminarse a través del líquido cerebroespinal y espacios subaracnoideos⁶. Como hemos comentado previamente, estos tumores suponen un 12,7% de los tumores de SNC en niños entre edades comprendidas entre 0 y 14 años, pero este porcentaje aumenta hasta el 24,9% si son niños menores de un año y a 20,2% en niños entre 1-4 años⁸.

El diagnóstico y la clasificación de los TE ha ido cambiando a lo largo de los años. En el 2007, la OMS realizó una clasificación basada sólo en características histológicas, donde existían tres grupos diferentes; los meduloblastomas (MB), los tumores rabdoideos teratoides atípicos (AT/RT por sus siglas en inglés) y los tumores neuroectodérmicos primitivos del sistema nervioso central (CNS-PNET en inglés). En este último grupo se incluían el resto de tumores embrionarios que no podían ser clasificados como MB ni AT/RT⁹.

Gracias a las técnicas de biología molecular, se comprobó que existía un amplio espectro de heterogeneidad biológica en este grupo de CNS-PNET. En la revisión de la clasificación de tumores cerebrales 2016⁴ la OMS integró esta información genética a la histológica, dando lugar a la aparición de nuevas entidades tumorales (**Figura 3**), presentándose cuatro grupos diferenciados:

- Los meduloblastomas, que ya tenían su propia entidad dividido en 4 grupos por diferenciación histológica, ahora se definen 5 nuevos subgrupos genéticos en base a la activación de vías de señalización o mutación de genes: 1) WNT activado, 2) SHH activado TP53 nativo, 3) SHH activado TP53 mutado 4) non-WNT/non-SHH grupo 3 y 5) non-WNT/non-SHH grupo 4.
- Los AT/RTs, también estaban definidos en el 2006, pero ahora, se requiere para su diagnóstico, la pérdida de expresión de la proteína SMARCB1 o SMARCA4 en casos más raros.
- Desaparece el grupo antiguamente llamado CNS-PNET, el cual incluía los ETANTR (*Embryonal tumor with abundant neuropil and true rosettes*), ependimoblastomas y meduloepiteliomas. Se crea un nuevo grupo, el tumor embrionario con rosetas de varias capas (ETMR), que incluye los antiguos ETANTR, ependimoblastomas y parte de los meduloepiteliomas. Los ETMR se subdividen a nivel molecular en base a la presencia o ausencia de una amplificación en el brazo largo del cromosoma 19 como ETMR-C19MC alterado o ETMR sin especificar, respectivamente¹⁰.
- El resto de los tumores se clasifican, únicamente, en base a la histología y se agrupan bajo el nombre de “otros tumores embrionarios” donde se incluyen los meduloepiteliomas, neuroblastoma de SNC y ganglioneuroblastoma del SNC.

Meduloblastomas		AT/RT		PNET SNC	ETMR
OMS 2007	OMS 2016	OMS 2007	OMS 2016	OMS 2007	OMS 2016
Clásico	WNT activado	Tumor embrionario del SCN con características rabdoideas	Tumor rabdoide teratoide atípico	ETANR	ETMR C19CM alterado
Desmoplásico nodular	SHH activado TP53 wildtype			Ependimoblastoma	ETMR Sin especificar
Nodulamente extensivo	SHH activado TP53 mutado				
Células largas	Non-WNT/non-SHH Grupo3*			Meduloepitelioma	Meduloepitelioma
Anaplásico	Non-WNT/non-SHH Grupo4*			Neuroblastoma del SNC	Neuroblastoma del SNC
				Ganglioneuroblastoma del SNC	Ganglioneuroblastoma del SNC

Figura 3. Clasificación de los tumores embrionarios por la OMS. Figura adaptada de Jessica C Pickles et al.11.

La incidencia de estos grupos de tumores embrionarios varía dependiendo de la edad en el momento del diagnóstico. Según los datos recogidos y presentados por CBTRUS de los tumores pediátricos del SNC entre 2007-2011¹² y resumidos en el gráfico de la figura 4, los meduloblastomas suponen más de la mitad de los casos en niños a partir de un año de edad. En cambio, si la edad de diagnóstico es menor de 1 año, el tumor embrionario de mayor frecuencia con un 42,9% es el AT/RT.

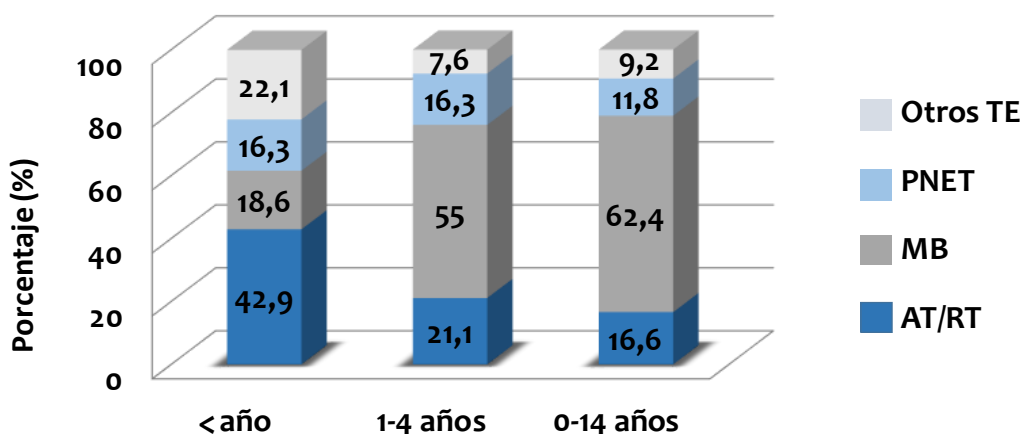


Figura 4. Distribución de los tumores embrionarios por rangos de edad¹².

3. TUMOR RABDOIDE TERATOIDE ATÍPICO: AT/RT

3.1 Introducción y epidemiología de los AT/RT

El AT/RT, como su nombre indica, es un tumor rabdoide (TR). Los TR son tumores pediátricos agresivos que afectan a tejidos blandos y pueden aparecer en diferentes órganos como riñones (al principio eran confundidos con el tumor de Wilms¹³), hígado, nervios periféricos, etc. Cuando el TR afecta al SNC, como ocurre en el 50% de los casos, se denominan AT/RTs¹⁴.

Es difícil realizar un estudio histórico de esta enfermedad ya que no fue descrita como entidad clínicamente independiente en base a sus características histológicas y genéticas hasta 1987 por Rorke *et al.*¹⁵. Hasta entonces eran diagnosticados erróneamente como meduloblastomas, PNET o carcinomas de plexo coroideo.

El AT/RT es un tumor muy agresivo que representa entre el 1% y 2% de todos los tumores pediátricos del SNC pero este porcentaje aumenta hasta el 10,1%, si tenemos en cuenta a los niños menores de 1 año^{16,17}. La presencia de este tumor en adultos es excepcional.

Su incidencia varía con la edad, desde 8,1 casos por cada de millón de niños menores de un año, hasta 0,6 casos entre niños de 5 a 9 años¹⁸. En el análisis de Ostrom *et al.*¹⁶ donde se analizaron 586 casos de AT/RT en niños entre 2001 y 2010, se observó que en más del 80% de los casos, la edad al diagnóstico era 3 años o menos, siendo la media de edad de 1 año. Aparecen con una frecuencia ligeramente más elevada en varones (54,2% del total), y casi el 80% de los pacientes son caucásicos y en su mayoría de origen no hispano.

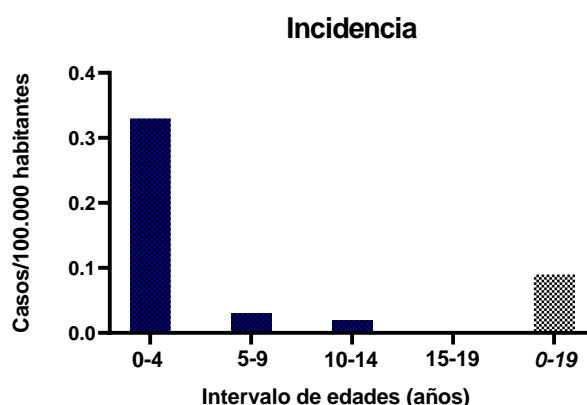


Figura 5. Gráfico representativo de la incidencia por intervalos de edades. Datos recogidos por CBTRUS de los tumores pediátricos del SNC (*Neuro Oncology*. 2020)

Este tumor se ha descrito en todas las localizaciones dentro del SNC. Los ATRT infratentoriales pueden aparecer en los hemisferios cerebelosos, ángulo cerebelopontino o tronco del encéfalo. Cuando aparecen en localización supratentorial son más frecuentes en los hemisferios cerebrales, aunque también pueden aparecer en el sistema ventricular, la región supraselar o la glándula pineal¹⁸. En la **tabla 1** se recogen la frecuencia con la que aparece el tumor AT/RT en las distintas localizaciones según datos recogidos de diferentes bases de datos: CBTRUS¹⁶, Registro Europeo de Tumores Rabdoides (EU-RHAB¹⁸), y *National Cancer Institute (NCI) Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER¹⁹)*.

Localización	CBTRUS ¹⁶	EU-RHAB ¹⁸	SEER ¹⁹
Infratentorial	28%	49%	52%
Supratentorial	36%	34%	48%
Médula espinal/cauda equina	5%	2%	10%
Otros	28%	10%	30%

Tabla 1. Frecuencia de aparición del tumor AT/RT en las diferentes localizaciones del SNC. Las columnas suman más de 100 debido a la aparición del tumor en varias localizaciones a la vez en el momento del diagnóstico.

3.2 Presentación clínica de los ATRT

La presentación clínica de estos tumores depende de varios factores como, la localización y tamaño del tumor, y la edad del paciente. Los síntomas más habituales son similares a los producidos por la hidrocefalia; cefaleas nocturnas, vómitos y alteración del nivel de consciencia. Además, pueden sufrir ataxia y regresión en las habilidades motoras²⁰.

Es un tumor con una evolución muy rápida lo que conlleva que, aproximadamente el 20% de los pacientes, presenten enfermedad metastásica en el momento del diagnóstico¹⁵, aumentando hasta un 71% en menores de 3 años²¹. La diseminación de la enfermedad habitualmente ocurre a través de las vías leptomeníngeas, formando depósitos tumorales en la columna vertebral y en otras áreas del encéfalo. La mayor causa de muerte se debe a la progresión de la enfermedad donde en el 58% de los casos existe una proliferación cráneo-espinal. La alta agresividad de esta enfermedad deriva

en un pronóstico bastante pobre, siendo la mediana de supervivencia de estos niños de unos 12 meses con un rango de entre 3 y 24 meses^{22,23}. Debido a su baja incidencia, la mayor parte de los datos clínicos con los que contamos sobre los AT/RT están basados en estudios retrospectivos formados por pequeños grupos de pacientes muy heterogéneos, donde sólo la edad, la localización y el estado metastásico del tumor en el momento del diagnóstico son considerados como factores pronósticos²⁴.

Radiológicamente, estos tumores no poseen una neuroimagen característica, siendo similares e indistinguibles del meduloblastoma y CNS-PNET. Se muestran, en general, como tumores sólidos grandes e hiperdensos, los cuales, pueden ir asociados con necrosis, hemorragias y calcificaciones intratumorales²⁵. La cirugía es necesaria para la obtención de la biopsia y así, confirmar el diagnóstico con un análisis histopatológico.

3.3 Características histológicas de los AT/RT

La morfología de los tumores AT/RT es diversa. Por un lado, por medio de tinción de hematoxilina/ eosina (HE), se observan componentes neuroepiteliales con la presencia de células pequeñas y azules, con núcleos hipercromáticos de forma redonda u oval, y citoplasma estrecho. Por otro lado, aparecen componentes mesenquimales y rabdoides, con células de gran tamaño, núcleos excéntricos y citoplasma eosinófilo. El diagnóstico puede ser difícil en base a criterios histopatológicos clásicos ya que las características son similares a los PNETs y MBs, por ello, es necesario realizar diagnósticos diferenciales. La verificación de ausencia de la proteína SMARCB1 (*SWI/SNF related, Matrix associated, Actin dependent Regular of Chromatin, subfamily B, member 1*) o SMARCA4 (*SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator of Chromatin, Subfamily A, Member 4*) por inmunohistoquímica es actualmente considerado como marcador diferencial de los AT/RTs. Otras características que suelen presentar estos tumores son un índice de proliferación muy elevado y positividad para vimentina, GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*), EMA (*epithelial membrane antigen*), citoqueratina, sinaptofisina, cromogranina y SMA (*smooth muscle actin*) en las inmunohistoquímicas²⁶.

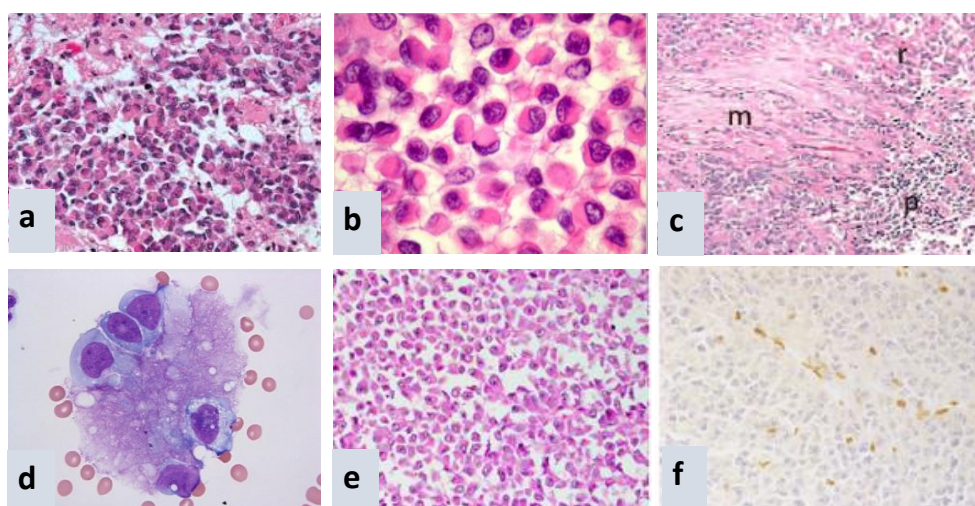


Figura 5. Histología de AT/RT donde se observan (a y b) áreas de fenotipo rabdoide formado por células rabdoides con núcleos excéntricos, grandes nucleolos y abundante citoplasma eosinófilo. (Hematoxilina eosina (HE) 20x, 40x). (c) HE donde se distinguen zonas de composición celular diferente: primitivo indiferenciado (p), mesenquimal (m) y células rabdoides (r) (HE, 20x). (d) Caracterización citológica del AT/RT en líquido cefalorraquídeo (tinción Wright-Giemsa, 1000x). Imágenes adquiridas de Cancer Cytopathology, Volume: 122, 04 August 2014. (e) HE de AT/RT y (f) histología de SMARCB1/INI1 donde se observa la ausencia de expresión nuclear en las células tumorales, mientras que los linfocitos infiltrantes o las células endoteliales vasculares revelan inmunorreactividad. 1000x) (European Journal of human genetics, volumen 25, páginas1170–1172(2017)).

3.4 Características genéticas y moleculares de los AT/RT

Sorprendentemente, a pesar de la naturaleza heterogénea de los AT/RTs y su alta malignidad, en los estudios de exoma sólo aparecen alteraciones recurrentes en el gen *SMARCB1*^{27,28}. Este gen está situado en el brazo largo del cromosoma 22 (22q11.23) y es considerado como un gen supresor de tumores mediante la regulación positiva de la transcripción de otros genes supresores de tumores²⁹. *SMARCB1* codifica a la proteína del mismo nombre SMARCB1, también llamada BAF47, INI1 (*INtegrase Interactor 1*) o hSNF5, la cual, es un componente esencial del complejo SWI/SNF (*SWItch/Sucrose Non Fermentable*)³⁰.

El complejo SWI/SNF es un complejo remodelador de cromatina que, mediante la hidrólisis de ATP, es capaz de desestabilizar las interacciones histonas-DNA, alterando el estado de la cromatina, adquiriendo así, la capacidad de regular la expresión génica³¹ (**Figura 6A**). Debido a esta capacidad de regulación, el complejo SWI/SNF está implicado en numerosos procesos biológicos esenciales como la reparación y la replicación del DNA, la regulación del crecimiento, división y diferenciación celular³².

Se ha demostrado que los complejos SWI/SNF pueden unirse a los promotores de aproximadamente un tercio de todos los genes³³.

En los últimos años, se ha relacionado la presencia de alteraciones en el complejo SWI/SNF con distintas enfermedades, entre ellas el cáncer. Alrededor del 20% de los tumores humanos contienen mutaciones, translocaciones o deleciones en alguna de las subunidades que forman el complejo³⁴ (**Figura 6B**). SWI/SNF está compuesto por numerosas subunidades, donde se incluyen: tres subunidades centrales o “*core*”, SMARCB1 (BAF47), SMARCC1 (BAF155) y SMARCC2 (BAF170), presentes en todas las variantes de los complejos, dos subunidades ATPasas mutuamente exclusivas, SMARCA4 (BRG1) y SMARCA2 (BRM) y entre 7 y 15 subunidades accesorias adicionales. Se han identificado dos variantes de este complejo que se diferencian en base a las subunidades de las que están compuesta: el complejo **BAF** contiene la subunidad ARID1A (BAF250a) o ARID1B (BAF250b) y el complejo *Polybromo associated BAF* (**PBAF**) con las subunidades PBRM1 (BAF180) y ARID2 (BAF200)³⁰ (**Figura 6C**). Como existen varias subunidades comunes a ambos complejos y están codificadas por familias de genes que a menudo muestran una expresión diferencial restringida a un linaje, es probable que exista un gran número de variantes de los complejos SWI/SNF en los mamíferos y que contribuyan a regular la expresión génica específica de un linaje y de un tejido^{35,36}.

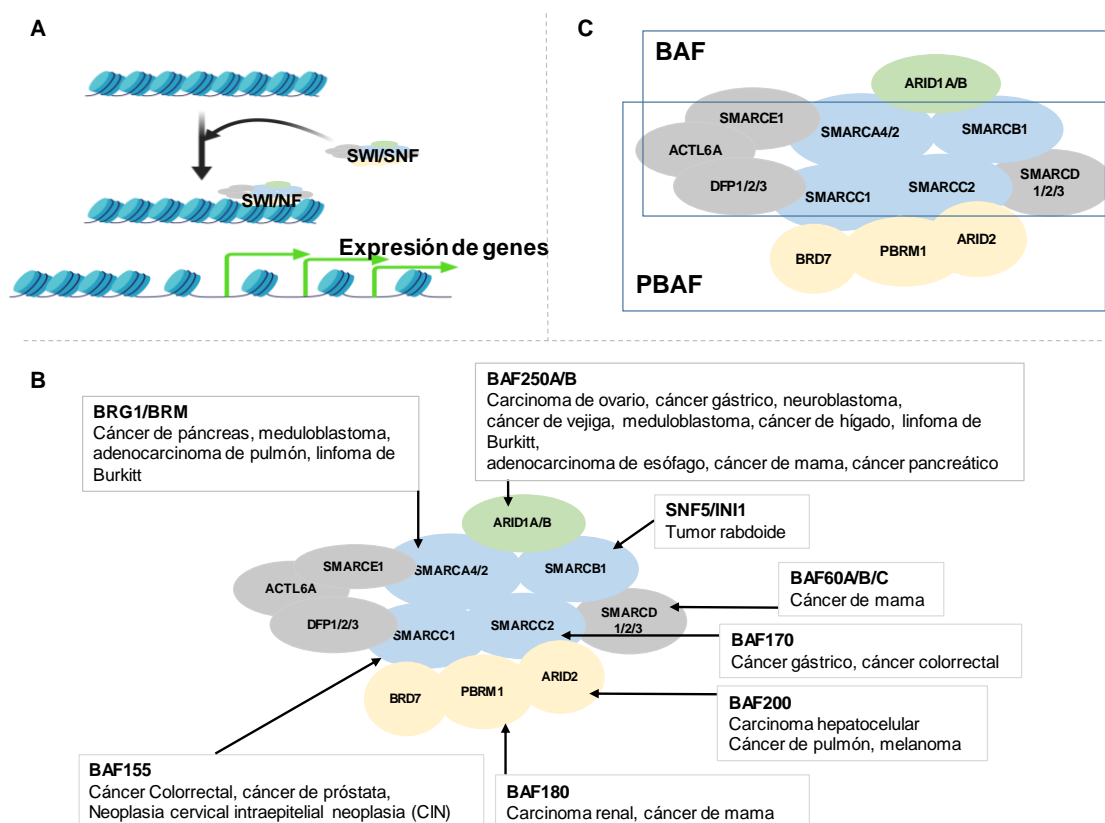


Figura 6. (A) Representación de la función de SWI/SNF. (B) Asociación de diferentes cánceres con mutaciones en las distintas subunidades. (C) Unidades del complejo SWI/SNF: Subunidades centrales en color azul, subunidades accesorias adicionales en gris y las subunidades de “firma” en verde para el complejo BAF y en vainilla para el complejo PBAF (imágenes adaptadas de K. Kim *et al.*).

Los AT/RTs se distinguen por la presencia de mutaciones bialélicas en el gen *SMARCB1* en el 98% de los casos causando la pérdida total de expresión de la proteína^{26,37}. Esta alteración puede aparecer de manera espontánea o en el contexto del síndrome de predisposición familiar a tumores rabdoide^{14,38}. En el resto de casos las mutaciones se dan en el gen *SMARCA4*, cuya proteína (BRG1) también forma parte del complejo SWI/SNF³⁹.

Las mutaciones preexistentes en heterocigosis de *SMARCB1* en línea germinal están descritas en el 20-35% de los pacientes con AT/RTs, los cuales, suelen ser más jóvenes y con presencia de enfermedad ya diseminada a la hora del diagnóstico⁴⁰. Además, tienen una mayor probabilidad de padecer más de un tumor de origen rabdoide³⁶. Aun así, en la mayoría de los casos la alteración ocurre de manera espontánea.

Desde 2016, gracias a la cooperación internacional, se consiguió un número elevado de muestras de pacientes donde se analizaron la expresión de genes y sus perfiles de

metilación, dando lugar a la distinción de tres subgrupos (**Figura 7**) con características moleculares y clinicopatológicas diferentes, como, por ejemplo, la localización del tumor, edad del paciente, nivel de metilación, activación de diferentes rutas, etc.^{27,43}:

- **Subtipo AT/RT TYR:** representa el 33% de los casos y se caracteriza por la elevada expresión de *TYR* (gen que codifica la tirosinasa). Aparecen mayoritariamente en niños menores de un año, en la parte infratentorial del cerebro. Suelen presentar una pérdida que afecta a gran parte o la totalidad del cromosoma 22.
- **Subtipo AT/RT SHH:** representa el subtipo más común, con el 40% de los casos y posee una alta expresión de los genes de la vía *Sonic hedgehog* (SHH) como *GLI2* y *MYCN*. Aparece por igual en la parte supratentorial e infratentorial y suelen ser niños menores de dos años. Está caracterizado por una aberración focal de *SMARCB1*, debida a una mutación o delección puntual.
- **Subtipo AT/RT MYC:** supone el 25% de los casos de ATRT y su característica principal es la alta expresión de *MYC*. Aparecen en la región supratentorial y médula espinal, y la mayoría de los pacientes son mayores de 6 años. El patrón genético típico que conduce a la inactivación de *SMARCB1* en estos tumores, es la pérdida de homocigosis de *SMARCB1*, cuya delección abarca varios cientos de kilobases^{27,43}. En contraste con AT/RT-TYR o AT/RT-SHH, las mutaciones puntuales son raras en ATRT-MYC.

Como hemos explicado anteriormente, un 2% de los casos de esta enfermedad presentan una mutación bialélica en *SMARCA4*. En un reciente estudio de estos casos tan especiales, los han asociado a una mayor frecuencia de mutaciones en línea germinal, a una presentación de la enfermedad a una edad más temprana y con un peor pronóstico en comparación con los casos con mutaciones en *SMARCB1*. Tras el análisis de metilación global y la secuenciación de RNA de los AT/RT-SMARCA4 se observó que formaban un grupo separado respecto a los AT/RT-SMARCB1, sugiriendo que AT/RT-SMARCA4 debe considerarse como un grupo molecular distinto⁴⁴. En la **figura 7** se describe el modelo propuesto por *Dörthe et al.* (2020) donde aparecen los tres grupos *SMARCB1* negativos, (Grupo1: grupo de Sonic hedgehog, Grupo2a: subgrupo tirosina, Grupo2b: subgrupo MYC), con datos basados en el estudio de Ho *et al.*⁴⁵ junto al

subgrupo AT/RT-SMARCA4, donde exponen sus características analizando bases de datos de diferentes estudios^{27,46} junto a los obtenidos por ellos.

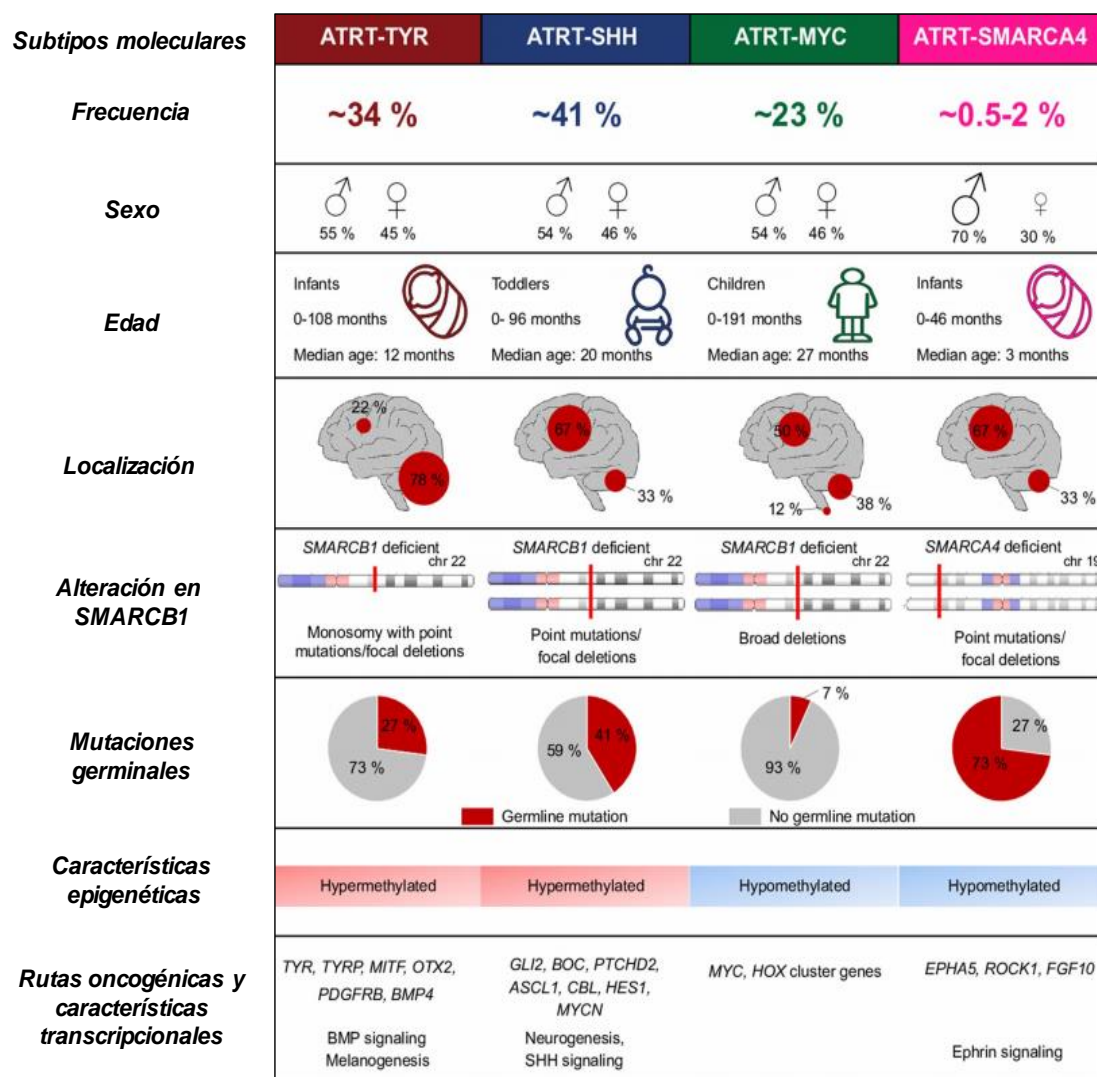


Figura 7. Modelo propuesto por *Dörthe et al.* (2020) para la integración ATRT-SMARCA4 en la clasificación por subgrupos de los AT/RT.

Con esta nueva “reclasificación” de los AT/RTs es posible afinar más en los tratamientos, ya que, dependiendo del subgrupo al que pertenezca, se pueden aplicar tratamientos en base a sus alteraciones moleculares, es decir, una terapia dirigida²⁷. A día de hoy, se han realizado diferentes estudios donde los fármacos van dirigidos a las principales vías alteradas, como los inhibidores de la Aurora kinasa A, de SHH/GLI o de la vía Wnt/ β -catenina, entre otros.

En la **tabla 2** se describen los diferentes compuestos o drogas testados tanto en líneas celulares de AT/RT, como en modelos animales y estudios clínicos. Datos recogidos por Lindsey M.Hoffman *et al*⁴⁷.

Modo de acción/Target	Clase de agente	Estudios Preclínicos	Ensayos clínicos en fase inicial
Quimioterapia clásica y agentes del daño al DNA	Agentes alquilantes	Carmustine,† thiotepa,† ifosfamida†	Carmustine, ifosfamida, temozolamida (NCT00946335, NCT01076530)
	Antimetabolitos		Metotrexate intraventricular (NCT01737671, NCT02684071)
	Análogos de guanosina	Ribavarin†‡	
	Agentes intercalantes	Actinomycin D,† idarubicin,† mitoxantrone,† doxorubicin†‡	
	Compuestos de platino	Oxaliplatino†	Oxaliplatino (NCT00047177)
	Inhibidores de topoisomerasas	Irinotecan,† etoposido†	Irinotecan (NCT00138216), Etoposido (NCT00392886)
	Alcaloide de la vinca	Vinorelbine,† vincristina†‡	
Inhibidores de kinasas	AKT	MK-2206†	
	ALK, TGFbeta	SB431542†	
	Aurora A	Alisertib (MLN8237)†	Alisertib (NCT02114229)
	EGFR-HER2	Lapatinib*†‡	
	IGF-1R	NVP-AEW451†	
	MEK	Selumetinib†	
	mTOR	Rapamycina*†	Rapamycina* (NCT03387020, NCT01331135)
	mTORC1/2	TAK228 (sapanisertib)†‡ Dasatinib,*†‡ imatinib,*† kw-2449,† nilotinib*,† r-1530,*† sorafenib,*† sunitinib,* Ponatinib*†	
	Multi-TKI		
	PDGFR/FGFR	Volasertib (BI6727)*†‡	
	PLK1	CFI-400945,†‡ CFI-400437,† centrinone,† centrinone-B†	
PLK4	Vatalanib†		
PTK7	Axitinib,*† cabozantinib,*†‡ pazopanib,*†‡	Cediranib (NCT00326664)	
VEGF			
Dirigidos al ciclo celular	Inhibidores de CDK2	Roscovitine†	
	Inhibidores de CDK4/6	Palbociclib*†‡	Ribociclib* (NCT03387020), Abemaciclib* (NCT02644460)
Compuestos dirigidos a epigenética	Bromo/BET	JQ1†‡	
	BRD9	BI-9564,† I-BRD9†	
	Agente desmetilante	5-AZA-2'-deoxycytidine (decitabine)*†	
	EZH2	3-Deazaneplanocin A (DZNep),† UNC1999,† tazemetostat*†‡	Tazemetostat* (NCT02601937, NCT02875548, NCT02601950), Pediatric MATCH (NCT03213665)
	G9a lisina metiltransferasa	UNC0638†	
	Histone deacetylase inhibitors (HDACi)	LAQ824 (Dacinostat),† vorinostat (SAHA),*† valproic acid,*† SNDX-275	Vorinostat* (SAHA), (NCT01076530, NCT00217412), valproic acid*
Compuestos específicos a vía/linaje	BMP	Dorsomorphin*†	
	Notch	DAPT*†	RO4929097 (NCT01088763)
	Inhibidor de WNT	Casin,*† niclosamide,† pyrrinium,† WNT-c59†	
	Anticuerpos		131-I-labeled monoclonal Ab: 8H9 (NCT00089245), 3F8 (NCT00445965)
	Ornitina descarboxilasa		DFMO (NCT03581240)
	Virus oncolítico	Measles virus (MV)*†‡	Virus measles modificado (MV-NIS, NCT02962167)
Otros compuestos	Inhibidor de ALDH	Disulfiram*†‡	
	Inhibidor de LOX	BAPN†‡	
	Diferuolmetano	Curcumin*†	
	Flavonoide	Apigenin*†	
	Agonista de PPARg	Ciglitazone†	
	Inhibidor de la liberación de exosomas	GW4869†	
	MDM2, MDM4, MDMX	Idasanutlin,*† ATSP-7041†	ALRN-6924 (NCT03654716)

Tabla 2. (†) Estudios in vivo (‡) estudios in vitro. (*) Agente sin la aprobación de la FDA. **(En negrita)** los agentes específicos aprobados por la FDA con datos preclínicos o clínicos que sugieren una penetración favorable de la barrera hemato-encefálica.

3.5 Tratamiento y pronóstico de los AT/RT

El tratamiento para los AT/RT se determina teniendo en cuenta los siguientes datos del paciente: edad, historial médico, tipo, localización y tamaño del tumor, y la extensión de la enfermedad. En general, suelen emplearse pautas de tratamiento multimodal combinando cirugía, quimioterapia con o sin rescate de células madre, quimioterapia intratecal y radioterapia¹⁷.

-Neurocirugía: además de ser necesaria para el diagnóstico de la enfermedad, el grado de resección realizado durante la cirugía afecta a la supervivencia, con lo cual, la resección debe ser lo más amplia posible con preservación de las funciones neurológicas. La supervivencia libre de enfermedad (SLE) en pacientes con AT/RTs sometidos a una cirugía con resección completa (GTR, *gross total resection*) es de 12,5 meses, siendo de 9,25 meses en los pacientes con resección parcial (STR, *subtotal resection*)^{17,48}.

-Quimioterapia: debido a la baja frecuencia de la enfermedad y la gran diversidad de tratamientos empleados a lo largo de los años, no existe una terapia estándar. Los tratamientos más comunes son los utilizados por **Children's Oncology Group (COG) 99703**, basado en vincristina (VCR), cisplatino (CDDP), ciclofosfamida (CPM) y etopósido (VP-16)⁴⁹. **The Children's Cancer Group (CCG-9921)** donde dividieron los pacientes en dos brazos distintos. Brazo A con CPM más CDDP, y brazo B con ifosfamida con carboplatino. Todos recibieron además VCR y VP-16, además del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF)⁵⁰. Los protocolos de **Intergroup Rhabdomyosarcoma Study III (IRSIII)** suministran a los pacientes VCR, CDDP, doxorubicina, dacarbacina, VP-16 y actinomicina D, además de triple terapia intracraneal (ITT) con metotrexato, hidrocortisona y citarabina^{48,51}.

Dada la corta edad de los pacientes en el momento del diagnóstico, existe más experiencia con la quimioterapia que con la radioterapia como tratamiento adyuvante postoperatorio. Sin embargo, los datos de la quimioterapia son muy difíciles de evaluar porque se han utilizado diferentes enfoques quimioterapéuticos y el número de pacientes que reciben el mismo régimen es pequeño. Los datos, en general, dan como resultado una respuesta al tratamiento con quimioterapia por lo tanto se considera que el

AT/RT es un tumor quimio-responder¹⁷. Las tasas de supervivencia global de los niños tratados con cirugía y quimioterapia son pobres (20% o menos a los 12 meses del diagnóstico), y no existen datos prospectivos para evaluar el papel de la quimioterapia^{49,50}.

-Radioterapia: Hoy en día, han surgido muchos estudios para intentar clarificar si la aportación de la radioterapia es beneficiosa o no para estos pacientes. El tratamiento incluye radioterapia sobre el lecho del tumor primario postcirugía y, en el caso de existir enfermedad diseminada detectada en el líquido cefalorraquídeo, radioterapia craneoespinal. Las dosis dependen sobre todo de la edad del paciente ya que, en niños muy pequeños (<18 meses), pueden causar secuelas importantes. En el estudio de Buscariollo *et al.* donde se analizaron los datos recogidos por SEER de 144 pacientes con AT/RT, existe una supervivencia significativamente superior ($p < 0,001$) en los pacientes que han recibido radioterapia con una mediana de supervivencia global (OS) de 34 meses respecto a los que no han recibido (OS 6 meses)²¹.

-Trasplante con células madre: a estos pacientes se les administra altas dosis de quimioterapia acompañada, por lo general, de radioterapia. Para intentar recuperar la médula ósea dañada, se realiza el trasplante autólogo de médula ósea (TAMO) o, también llamado, rescate con células madre (*Stem Cell Rescue*; SCR).

Los factores que determinan a día de hoy la supervivencia son: edad menor de un año, resección quirúrgica incompleta, presencia de enfermedad metastásica, y la presencia de mutaciones germinales de *SMARCB1/SMARCA4*⁵². Todos los pacientes, en general, progresan a la enfermedad y acaban falleciendo entre los 6 y los 12 meses después del diagnóstico, siendo peor la supervivencia en pacientes con enfermedad diseminada en el momento del diagnóstico. En una revisión del registro del SEER con datos de entre 1973 y 2008 la mediana de la supervivencia era 10 meses²¹.

Los menores de 3 años de edad, tienen un peor pronóstico, el cual se relaciona con la menor tolerancia de este grupo a procedimientos quirúrgicos, demoras en el diagnóstico, uso limitado de la radioterapia por el riesgo de deterioro funcional del encéfalo en desarrollo, así como sus efectos adversos (disminución del coeficiente intelectual, déficit cognitivo y disfunciones neuroendocrinas)⁵³.

A pesar de la gran evolución en el conocimiento de las bases moleculares de esta enfermedad y, con ello, el desarrollo de nuevos ensayos clínicos con tratamientos

multimodales y terapia dirigida, el pronóstico de los niños afectados por AT/RT sigue siendo malo. Es necesario investigar nuevas vías de tratamiento, con herramientas terapéuticas diferentes, para intentar alcanzar mejores resultados.

4. VIROTERAPIA

4.1 Introducción

La viroterapia, también llamada terapia vírica o terapia vírica oncolítica, consiste en el tratamiento de los pacientes administrándoles virus selectivos de tumor que promuevan la destrucción de las células cancerígenas minimizando el efecto sobre las células sanas⁵⁴.

Desde principios de 1900 se conoce el potencial de los virus para inducir una respuesta antitumoral. Se documentaron casos donde existía una regresión tumoral en pacientes coincidentes con infecciones víricas, tales como, una gripe (virus influenza⁵⁵) o tras la vacunación de la rabia debido a una mordedura de perro⁵⁶.

Uno de los primeros trabajos relacionados con la viroterapia fue desarrollado por el cirujano William Coley, quien, en 1891, inyectó el virus de la erisipela directamente en el lecho del tumor. La supervivencia del paciente, al que sólo se le daban unas semanas de vida, alcanzó los 8 años. Hoy en día este tratamiento se conoce como “las toxinas de Coley”. Con el descubrimiento de los rayos-X por Roentgen en 1895, la radioactividad por Marie Curie en 1898 y la aparición de la quimioterapia cuando en 1950 Farber comenzó a tratar a pacientes con agentes químicos los estudios basados en tratamientos con virus dejaron de tener interés⁵⁷.

A pesar de ello, existe documentación que revela que, durante las décadas de los 40 y 50, diferentes tumores cancerígenos fueron tratados con diversos virus como las paperas, la hepatitis, el virus del Nilo occidental o el virus de Semliki Forest consiguiendo diferentes resultados: unos alargaron la supervivencia, otros consiguieron la desaparición total del tumor, aunque algunos murieron directamente por el tratamiento recibido y no por el cáncer. Son los llamados virus oncolíticos (VOs) de primera generación; virus, generalmente atenuados, no modificados *in vitro*^{58,59}. Hasta 1990 la preocupación por la seguridad, sumado a la reticencia de los médicos a administrar patógenos a los pacientes, limitó el uso de la viroterapia como terapia

antitumoral en primera línea. A partir de entonces, gracias a los avances técnicos y a la investigación, se profundizó en el conocimiento del cáncer y de los virus, comenzándose a descubrir detalles sobre el mecanismo de ataque de los virus sobre las células tumorales. Al mismo tiempo, se empiezan a diseñar técnicas para alterar los genes de los virus mediante ingeniería genética con el fin de, por un lado, potenciar su capacidad de ataque sobre las células cancerígenas y, por otro, evitar que los virus provoquen efectos no deseados. Este último punto incluye modificar los virus para darles especificidad de tumor. Este tipo de virus modificados genéticamente se han denominado VOs de segunda generación⁶⁰. Así pues, virus como los herpes virus, gripe o adenovirus, pueden transformarse en oncolíticos gracias a modificaciones genéticas que ayuden, por ejemplo, a seleccionar y penetrar sólo en las células tumorales y no en las normales, replicarse en células con ausencia de genes supresores de tumores (*TP53* o *RBI*) o sólo en presencia de características específicas del tumor. En la actualidad, gracias a la capacidad de modificación del genoma viral, se pueden crear “virus armados”, es decir, VOs que expresan transgenes terapéuticos aportando nuevas funciones al virus, para aumentar la eficacia y la seguridad. Son los llamados VOs de tercera generación^{61,62}.

Se han estudiado diferentes especies de virus como terapia contra el cáncer, tanto virus de DNA como virus de RNA (**Figura 8**). El primer virus oncolítico probado en pacientes fue el adenovirus Onyx-15 en paciente con tumores de cabeza y cuello recurrente⁶³. Desde entonces, muchos tipos de virus, pertenecientes, entre otras, a las familias *Adenoviridae*, *Herpesviridae*, *Picornaviridae*, *Reoviridae* o *Poxviridae* se encuentran en diferentes fases de estudios para distintos tipos tumorales^{64,65}. La aprobación de T-VEC (*Talimogene laherparepvec*) por la FDA (*US Food and Drug Administration*) para uso clínico en el tratamiento del melanoma recurrente, ha abierto las puertas al desarrollo de nuevas terapias basadas en VOs en combinación con la inmunoterapia, radioterapia y quimioterapia⁶². A partir de los estudios preclínicos y clínicos ya desarrollados se concluye que, tras el tratamiento con VOs se logra una infección sólida y específica en los tumores^{66,67}. La eficacia oncolítica de muchos virus está relacionada, al menos en parte, con la inducción de potentes respuestas inmunitarias antitumorales^{68,69}. Estas respuestas inmunitarias comienzan cuando, tras la infección y replicación viral, la célula tumoral se lisa y libera antígenos tumorales en el microambiente, que son presentados a las células T por las células presentadoras de

antígeno endógenas (APC). Este es un paso crucial para inducir y mantener las respuestas de las células T antitumorales.

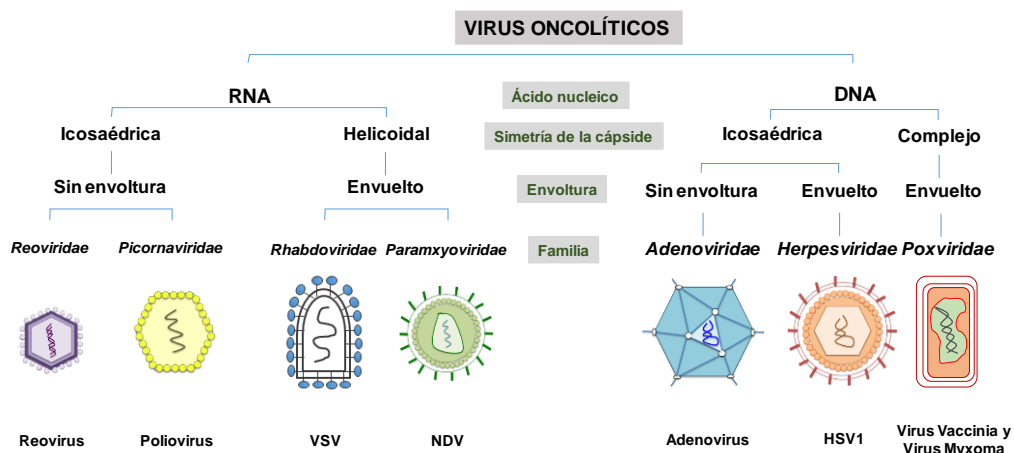


Figura 8. Esquema de los virus oncolíticos más utilizados en viroterapia contra el cáncer (N. Martínez-Velez).

4.2 Viroterapia en tumores cerebrales

Los tumores cerebrales, como glioma de alto grado (*high-grade glioma*, HGG, en inglés), glioblastomas (GB) o glioma difuso intrínseco de puente (DIPG), se caracterizan por su alta agresividad, crecimiento infiltrativo y su resistencia a diferentes tratamientos. Pese al avance de las terapias (cirugía, radioterapia y quimioterapia), el pronóstico ha permanecido constante durante los últimos años. Gracias al desarrollo en técnicas de biología molecular, se han ido incorporando nuevos tratamientos entre los que se encuentran el uso de los VOs⁷⁰. La viroterapia supone un buen candidato como tratamiento de estos tumores tan agresivos debido a sus características principales:

- Replicación selectiva en células tumorales, sin afectar a las normales
- Las células diana no poseen mecanismos de defensa ante los VOs
- Capacidad de expansión del virus a las células adyacentes tras la infección de algunas células
- Capacidad de promover una respuesta inmune contra el tumor^{71,72}.

Se han generado una gran cantidad de virus con potencial actividad oncolítica para el tratamiento de gliomas. Se han desarrollado a partir de diferentes familias de virus, y cada uno de los agentes posee un mecanismo distinto de acción sobre la célula tumoral⁷³. Los adenovirus oncolíticos, junto a HSV (virus del herpes simple), son

algunos de los más ensayados a nivel clínico para los tratamientos de los tumores cerebrales (**Tabla 2**), en donde se incluyen también los tumores pediátricos del SNC. A pesar de los buenos resultados preclínicos en eficacia antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo*⁷⁴⁻⁷⁷, pocos estudios trasladados a la clínica han resultado beneficiosos para los pacientes^{78,79}.

Fase clínica	Enfermedad	Tipo de terapia	Identificador	Diseño
I	Recurrent supratentorial GBM	PVS-RIPO : live attenuated poliovirus vaccine with human rhinovirus type 2 IRES	NCT01491893	Dose escalation of intratumoral convection-enhanced delivery
I	Recurrent GBM	MV-CEA : measles Edmonston vaccine strain expressing CEA	NCT00390299	Group 1: dose escalation of resection cavity administration Group 2: dose escalation of intratumoral and resection bed administration
I	Children with relapsed or refractory brain tumors	Reolysin : reovirus + GM-CSF	NCT02444546	Dose escalation of i.v. virus + GM-CSF
I	Recurrent or progressive GBM, anaplastic astrocytoma, or gliosarcoma	M032 : ICP34.5 deleted HSV expressing IL-12	NCT02062827	Dose escalation of intratumoral infusion
I	Refractory or recurrent childhood HGG	HSV1716 : ICP34.5-deleted HSV	NCT02031965	Dose escalation of intratumoral and resection bed administration
I	Recurrent supratentorial brain tumors in children	G207 : ICP6-inactivated and ICP34.5-deleted HSV + radiation	NCT02457845	Dose escalation of intratumoral infusion of virus + 5 Gy radiation
I/II	Recurrent or progressive GBM	G47Δ : ICP6 inactivated, ICP34.5 deleted, and ICP47-deleted HSV	JPRN-UMIN000002661	Dose escalation of intratumoral administration
I	First GBM recurrence	DNX2401 : E1A-deleted adenovirus targeted to integrins with RGD peptide + temozolomide	NCT01956734	Dose escalation of intratumoral or resection bed administration with short-course temozolomide
Ib	Recurrent GBM or gliosarcoma	DNX-2401 : E1A-deleted adenovirus targeted to integrins with RGD peptide + IFN-γ	NCT02197169	RCT; group 1: intratumoral injection of virus Group 2: intratumoral injection of virus + IFN-γ
I	DIPG	DNX-2401 : E1A-deleted adenovirus targeted to integrins with RGD peptide	NCT03178032	Dose escalation of intratumoral administration

Tabla 2. Ensayos clínicos basados en VOs que actualmente se encuentran activos para los gliomas y DIPG⁸⁰.

4.3 Viroterapia en AT/RT

Los estudios preclínicos con virus oncolíticos que existen a día de hoy en los tumores AT/RT son escasos. El primer VO probado fue vvDD (*double-deleted vaccinia virus*) donde comprobaron la seguridad y eficacia oncolítica del virus, tanto en líneas celulares como en experimentos *in vivo*, donde administraban el vvDD de manera intravenosa⁸¹. *Studebaker et al.* han experimentado con dos virus oncolíticos diferentes: virus herpes rRp450 en meduloblastoma y AT/RT⁸², y el virus del sarampión (*MV* por sus siglas en inglés, measles virus), con el que ya habían descrito su eficacia replicativa y antitumoral en meduloblastomas⁸³. En AT/RT también han obtenido buenos resultados utilizando *MV*, incluso en el tratamiento de tumores diseminados en médula ósea⁸⁴. Esto ha dado paso a la apertura de un ensayo clínico multicéntrico (*NCT02962167*) donde tratan

pacientes pediátricos y jóvenes adultos con MB en recurrencia y AT/RT, administrando una o varias dosis de MV-NIS.

5. ADENOVIRUS

Los adenovirus (Ad) son virus responsables de variedad de enfermedades o malestares provocando infecciones en las vías respiratorias (neumonía o bronquitis), en el sistema digestivo (gastroenteritis) o conjuntivitis⁸⁵. Se aislaron por primera vez en 1953 y desde entonces se han descubierto más de 100 serotipos diferentes, de los cuales más de 60, agrupados en 7 especies de la A-G, son capaces de infectar al ser humano. Cada serotipo presenta un tropismo tisular y unas manifestaciones clínicas particulares⁸⁶. A pesar de la existencia de gran cantidad de diferentes especies y serotipos, los serotipos que infectan a los humanos que incluyen el subgrupo C, como Ad2 y Ad5, son los mejor caracterizados desde el punto de vista molecular y genético⁸⁷, destacando el Ad5, el cual afecta a las vías respiratorias altas y normalmente provoca infecciones parecidas a la gripe⁸⁸.

5.1 Estructura y genoma del adenovirus 5 (Ad5)

Son virus de DNA lineal bicatenario de 36 kb de longitud caracterizado por no tener envoltura. Representan a los virus de mayor tamaño no encapsulados (alrededor de 90 nm de diámetro sin contar la fibra), aunque ello no le impide internarse dentro de la célula por medio de endosomas⁸⁹. El virión tiene forma icosaédrica (20 superficies triangulares y 12 vértices) y está formado por una cápside, constituida por 252 capsómeros (representando el 87% del peso del virión), y por el núcleo, que contiene el genoma (DNA viral) asociado a 4 proteínas internas, denominadas también *core*: proteína terminal (TP), proteínas básicas V y VII y la proteína Mu⁹⁰.

De los 252 capsómeros que forman la cápside, 240 son hexones, los cuales dan lugar a los lados de la superficie icosaédrica, y 12 son pentones, que conforman los vértices. A su vez, los pentones están formados por un pentámero de la proteína *penton base* que cierra el vértice de la cápside, y la proteína fibra anclada al centro de esta base. La fibra es una proteína trimérica que emerge del pentón y se divide en 3 dominios: 1) dominio de la cola proximal *tail*, encargada de anclar la proteína a la cápside, 2) el botón globular distal *knob*, el cual reconoce y se une a los receptores de las células y 3) un dominio fibrilar de unión entre los otros dos dominios llamado *shaft* (**Figura 10**)⁹¹. Los

hexones, pentones y la fibra, llamadas proteínas mayoritarias, están formadas por proteínas específicas, siendo la fibra quien determina el tropismo del adenovirus⁸⁹. En la estructura de la cápside también existen unas proteínas minoritarias o proteínas de cemento, correspondientes a las proteínas IIIa, VI, VIII y IX⁹².

El genoma, como hemos descrito antes, está formada por una única molécula de DNA lineal de doble cadena de aproximadamente 36 kb de longitud donde se distribuyen los genes del adenovirus (aproximadamente 40) en diferentes subunidades de transcripción: subunidad temprana, intermedia o tardía, dependiendo si la transcripción se produce antes, durante o después de la replicación⁹³. La subunidad temprana (*early*) está formada por 5 unidades: E1A, la primera en ser transcrita, inhibe a la proteína retinoblastoma (Rb) y activa la transcripción de otros genes virales, E1B que, por su unión a p53, inhibe la apoptosis, E2 codifica elementos de control de la replicación viral, E3 interviene en la modulación de la respuesta anti-viral del huésped contra el adenovirus, entre otras funciones, y, por último, la unidad transcripcional E4, que con sus diferentes *splicings*, facilita la replicación eficaz del DNA viral, se encarga del control de la expresión de las proteínas tardías y evita que los genomas virales se concatenen⁹⁴. En la subunidad intermedia (*intermediate*) nos encontramos con genes que codifican las proteínas IX, IVa2 y L4-22k/33k encargadas de activar la progresión a la fase tardía (*late*)⁹⁵, en la que se activarán las unidades de transcripción L1, L2, L3 L4 y L5 controladas por el *Major Late Promoter* (MLP), único promotor de esta subunidad. Las proteínas a las que dan lugar en esta fase, forman la cápside, acompañados de todos los elementos necesarios para el correcto ensamblaje y maduración de los viriones⁹⁶.

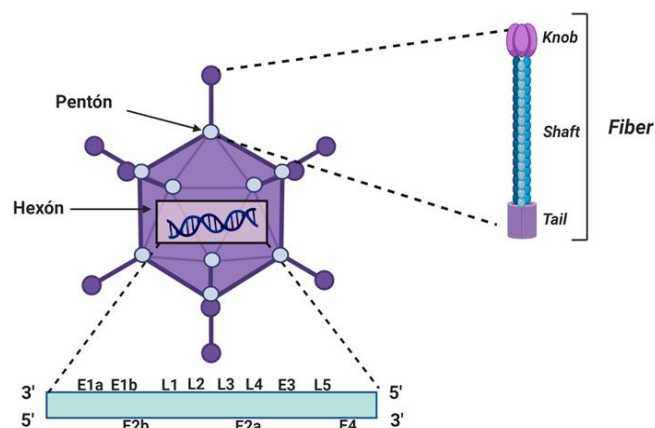


Figura 10. Representación esquemática del genoma y estructura del adenovirus Ad5.

5.2 Ciclo de replicación viral

Un ciclo de replicación viral dura entre 32-36 horas, comenzando la expresión de las subunidades transcripcionales tempranas dos horas después de la adsorción del adenovirus. Al tratarse de un virus dsDNA (DNA de doble hebra) es necesario su desplazamiento hasta el núcleo de la célula huésped para replicarse y formar nuevos viriones.

La entrada del virus a la célula es básicamente un mecanismo de endocitosis mediado por un receptor dividido en dos fases. En una primera fase, la unión del virus a la superficie celular se realiza mediante la interacción de la parte *knob* de la fibra del virus con el receptor situado en la membrana de la célula a infectar. Estos receptores de unión son diferentes dependiendo del tipo de adenovirus y de la célula huésped. En nuestro estudio, nos centramos en el Ad5 por lo que el receptor principal de reconocimiento es la proteína CAR (*Receptor Coxsackie-Adenovirus*), miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas⁸⁷. Esta primera unión de alta afinidad permite acercar la cápside viral a la célula diana para dar lugar a la segunda fase, la internalización en la célula. Para ello, el virus se vale de un motivo de unión a integrinas (RGD) presente en la proteína de la base del pentón, que le permite interaccionar con integrinas $\alpha_v\beta_3$ o $\alpha_v\beta_5$ de la membrana celular y promueve su agrupación (*clusterización*). Esta *clusterización* de integrinas dispara el mecanismo de internalización por endocitosis a través de vesículas recubiertas de clatrina para formar endosomas⁹⁷. El pH ácido existente en el interior de los endosomas promueve el comienzo de un desagregado gradual de la cápside que permite el escape del virus al citosol y su transporte al núcleo a través de los microtúbulos hasta llegar al poro nuclear. En este punto, la cápside se acaba de desmontar completamente y el genoma del virus se introduce en el interior del núcleo a través de los poros nucleares⁹⁸.

Una vez en el interior del núcleo, se inicia el proceso de la transcripción temprana del promotor constitutivo E1 con la producción de la proteína E1A. Esta proteína, disocia el complejo pRb-E2F1, y la liberación de E2F1 provoca la entrada de la célula en fase S y activa la expresión de las proteínas necesarias para la replicación del genoma viral: polimerasa viral, proteína terminal (TP) y *DNA binding protein* (DBP). La replicación del genoma promueve la producción de las proteínas necesarias para la formación estructural de los viriones, es decir, ensamblaje y la encapsulación del material genético.

Esta acción se lleva a cabo con la transcripción de los genes tardíos, controlados por el promotor MLP. El ensamblaje de los viriones se da en el mismo núcleo celular donde, una vez formada, se introduce el DNA vírico y las proteínas nucleares. Finalmente, la cápside pasa por un proceso de maduración en el que interviene la proteasa del adenovirus, tras lo cual se produce la lisis celular y la dispersión de los nuevos viriones hacia otras células⁹⁵.

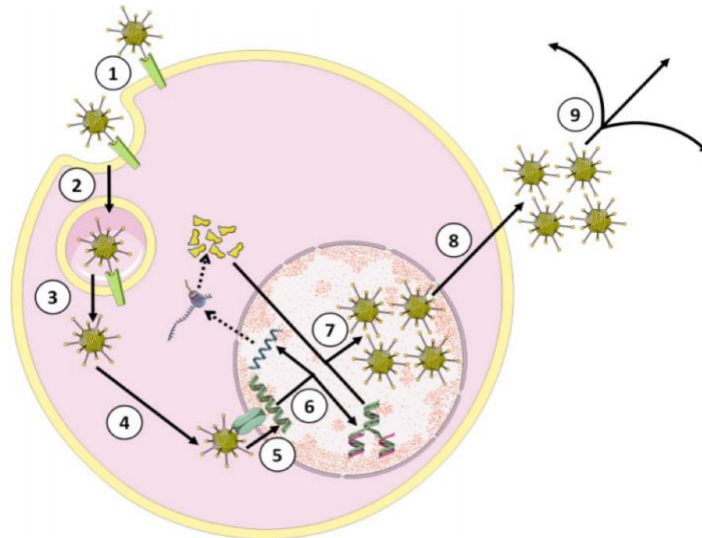


Figura 11. Representación de las diferentes fases del ciclo viral. (1) Unión al receptor, (2) internalización en la célula, (3) penetración en el citosol, (4) migración hasta el núcleo, (5) traslación del genoma al interior del núcleo, (6) expresión de los genes virales y replicación del genoma, (7) formación de nuevos viriones (8) salida de la célula huésped, (9) dispersión hacia nuevas células. Imagen adaptada de Marc García-Moure.

6. ADENOVIRUS ONCOLÍTICOS

6.1 Estrategias para condicionar la replicación del adenovirus

Hasta la fecha, los adenovirus más utilizados en viroterapia para el cáncer son derivados del Ad5. En el estudio de los adenovirus replicativos condicionados (CRAds), cuya replicación sólo es permisiva en células tumorales sin afectar a las normales, ha habido una gran evolución. Las estrategias para condicionar la replicación del adenovirus a células tumorales se pueden dividir en dos grandes bloques. En un primer grupo nos encontramos con virus modificados en los que la expresión de proteínas clave adenovirales (típicamente E1) está controlada por promotores específicos de tumor tales

como el promotor de telomerasa o *cox-2*^{99,100}. El segundo grupo de modificaciones consiste en generar CRAds mediante la modificación de proteínas clave del adenovirus, de tal manera que la progresión del ciclo viral sólo se pueda dar en células tumorales. A este último grupo pertenecen los adenovirus dl1520 y Delta-24. El virus dl1520 (Onyx-015)¹⁰¹ fue el primero en ser testado en humanos. Se caracteriza por una deleción del locus E1B del adenovirus que evita que se replique en células con el p53 nativo¹⁰². La presencia de genes adenovirales que son dianas de reguladores del ciclo celular, dio lugar al desarrollo de adenovirus oncolíticos que estaban controlando otras rutas celulares. Una de ellas, es la ruta del retinoblastoma (Rb) surgiendo el adenovirus Delta-24¹⁰³ caracterizado por una deleción de 24 pb en el dominio de unión a Rb de la proteína E1A del virus⁷⁴(**Figura 13A**). Esta unión, da lugar a la liberación del factor de transcripción E2F permitiendo la progresión del ciclo viral para la producción de nuevos viriones¹⁰⁴. Al carecer de este dominio, la modificación Delta-24 condiciona la replicación del adenovirus a aquellas células con alteración en la vía del Rb/p16 como ocurre en mayoría de las células tumorales¹⁰⁵ (**Figura 12**).

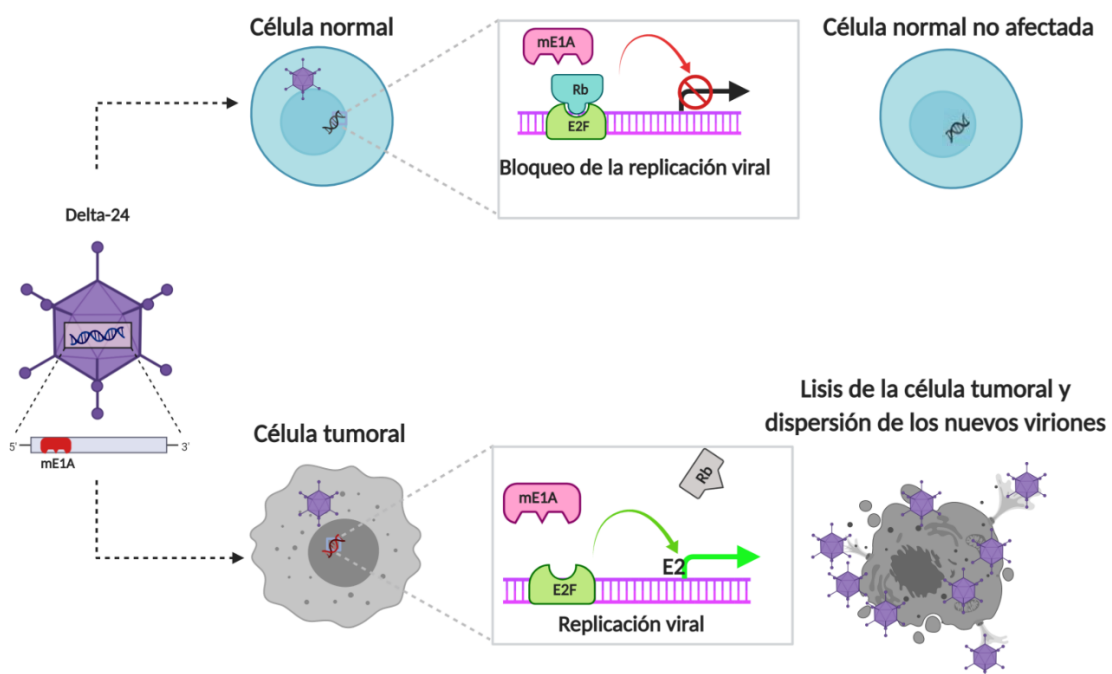


Figura 12. Imagen que representa la progresión del ciclo del virus oncolítico Delta-24 y posterior infección en células sanas y en células tumorales.

6.2 Estrategias para modificar el tropismo del adenovirus

Los Ad5 se unen a la célula diana a través de los receptores CAR expresados en la membrana celular de las mismas. Estos receptores se expresan en células normales, pero los niveles de expresión en diferentes células tumorales, entre los que se encuentran las de origen cerebral, son bajos¹⁰⁶. Así pues, es necesario modificar el tropismo de los adenovirus para facilitar su entrada en la célula tumoral. Una de las estrategias consiste en la pseudotipación de los adenovirus, es decir, substituir la fibra nativa del Ad5 por la fibra de otros adenovirus con tropismo por receptores diferentes que sí se puedan encontrar en la célula tumoral¹⁰⁷. En otros casos, pequeñas modificaciones de la fibra del Ad5 son suficientes para facilitar la entrada del virus en la célula tumoral. Para activar una nueva vía de infección independiente de los receptores CAR, Suzuki *et al* incorporaron una secuencia de tres aminoácidos, Arg-Gly-Asp (motivo RGD)⁷⁴ en el *loop* HI del dominio *knob* de la fibra (**Figura 13B**). Este péptido de adición permite que el virus interactúe con las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ de la superficie celular (sobrexpresadas en la mayoría de la células tumorales) y su internalización en la célula¹⁰⁸, lo que permite la infección en ausencia de CAR.

6.3 Delta-24-RGD

El adenovirus oncolítico Delta-24-RGD contiene modificaciones tanto a nivel de replicación como de tropismo. Por un lado, contiene una deleción de 24 pb del gen E1A que le confiere especificidad para replicarse exclusivamente en células tumorales con la vía Rb/p16 alterada, así como la incorporación del motivo RGD en el *loop* HI del *knob* de la fibra, citada anteriormente. Así surgió el CRAde de segunda generación Delta-24-RGD (DNX-2401)¹⁰⁹.

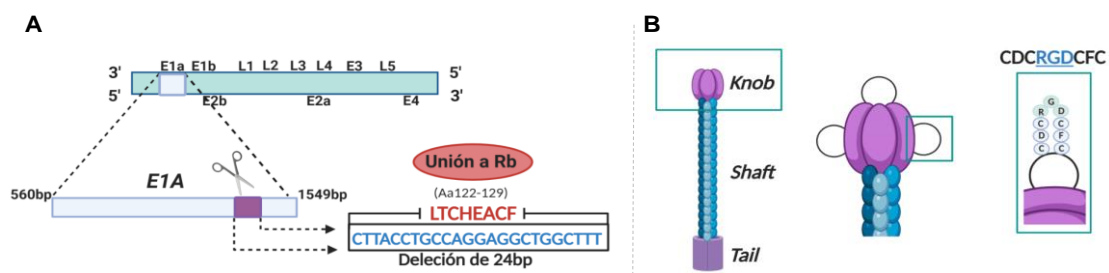


Figura 13. Representación de las modificaciones realizadas en Delta-24-RGD. (A) Deleción de 24bp en E1A (B) Inserción del péptido RGD.

Los resultados prometedores obtenidos tras el tratamiento con el adenovirus Delta-24-RGD en estudios preclínicos^{76,109-111}, permitió el desarrollo de distintos ensayos clínicos en el tratamiento del cáncer de ovario¹¹², gliomas de alto grado recurrentes⁷⁹ y glioma difuso intrínseco de puente (*DIPG*)¹¹³ (*NCT00805376*, *NCT01956734*, *NCT03178032*), concluyendo que, el uso de esta herramienta terapéutica es segura y, en general, es beneficiosa para los pacientes. El análisis de las muestras tumorales obtenidas en cirugía post-tratamiento en los ensayos de gliomas de alto grado revelaron varios datos importantes: DNX-2401 se estaba replicando, dispersándose dentro del tumor e induciendo una respuesta inflamatoria, reflejada por la aparición de células CD8+ T-bet+ infiltradas en el tumor¹¹⁴. Tras estos resultados, se activó un estudio fase Ib randomizado donde se administraba DNX-2401 versus DNX-2401/interferón gamma (INF- γ) sin diferencia en supervivencia entre los dos grupos (*NCT02197169*)¹¹⁵. Los buenos datos de seguridad, eficacia e inmunoestimulación llevaron a la apertura de otro ensayo clínico de fase II (todavía en marcha) para recurrencias de glioblastoma/gliosarcoma en el cual se combinó el DNX-2401 con la administración intravenosa de un anticuerpo monoclonal antagonista de PD-1 (pembrolizumab) (*NCT02798406*).

El estudio de diferentes rutas de señalización alteradas en los AT/RTs ha permitido realizar un amplio abanico de tratamientos preclínicos y clínicos con una potencial actividad terapéutica, pero existen factores como, la rápida evolución de la enfermedad, su rareza y la gran vulnerabilidad de la población a los que afecta, que dificultan el análisis de su evolución. Los pronósticos siguen siendo malos y urge la aparición de nuevas terapias para esta enfermedad tan agresiva. A día de hoy, los tratamientos con virus oncolíticos en AT/RT son escasos e, inexistentes, en el caso de la utilización de adenovirus oncolíticos. Dados los buenos resultados, tanto a nivel de seguridad como de respuesta, obtenidos en los diferentes ensayos clínicos con el adenovirus Delta-24-RGD, creemos que sería una buena herramienta terapéutica en el tratamiento de los tumores de AT/RT.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Los AT/RTs son tumores pediátricos raros del SNC muy agresivos que afectan sobre todo a niños de edad muy temprana, la mayoría menores de un año. A pesar de los tratamientos multimodales y de la aplicación de terapias dirigidas, el pronóstico sigue siendo muy pobre con una supervivencia de menos de 12 meses. Por lo tanto, el AT/RT es una enfermedad incurable y apremia el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. En nuestro laboratorio, hemos tratado diversos tumores sólidos pediátricos agresivos como HGG, DIPG y PNET con el adenovirus Delta-24-RGD obteniendo resultados positivos tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos tumorales murinos. Estos datos van acompañados de los resultados de ensayos clínicos donde se confirma la seguridad del adenovirus. Por ello, en este trabajo hipotetizamos que el adenovirus oncolítico Delta-24-RGD sería una terapia eficaz en el tratamiento de los AT/RTs, no sólo por su acción antitumoral, sino, además, por la potenciación de la respuesta inmunitaria del propio paciente.

OBJETIVOS

Para demostrar nuestra hipótesis planteamos los siguientes objetivos:

1. Evaluar y caracterizar la eficacia antitumoral del virus oncolítico Delta-24-RGD en cultivos de AT/RT.
2. Caracterizar el efecto antitumoral del Delta-24-RGD *in vivo* en diversos modelos ortotópicos que recapitulan las diferentes presentaciones clínicas de este tipo de tumores:
 - a. Modelo infratentorial
 - b. Modelo supratentorial
 - c. Modelo diseminado
3. Evaluar la respuesta inmune antitumoral tras el tratamiento con Delta-24-RGD en un modelo murino inmunocompetente.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. ESTUDIOS IN VITRO

1.1 Líneas celulares y mantenimiento

El origen de las diferentes líneas celulares humanas de AT/RT reclutadas fue diverso. Por un lado, las líneas CHLA-02-ATRT (CRL-3020), CHLA-04-ATRT (CRL-3036), CHLA-05-ATRT (CRL-3037) y CHLA-06-ATRT (CRL-3038) las obtuvimos de la ATCC (*American Type Culture Collection*). Las cuatro líneas fueron cultivadas siguiendo las especificaciones del proveedor.

Por otro lado, CHLA-266 y BT-12, líneas humanas de AT/RT, fueron cedidas por el repositorio *Children's Oncology Group Cell* (COG) y ambas se mantuvieron en medio IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*; Gibco #12440053) suplementado con 20% de FBS (Suero fetal bovino; Gibco #10270106), 4 mM L-Glutamina (Millipore #030201B), 1X ITS (5 µg/ml insulina, 5 µg/ml transferrina 5 ng/mL ácido selénico, Gibco #41400-045) and 1X penicilina/estreptomicina. “*Division of pediatric Neurosurgery of Seoul National University*” nos suministraron las líneas SNU.AT/RT-8 y SNU.AT/RT-9. Éstas se mantuvieron en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; Gibco #41966-02) con 10% de FBS, y 1X penicilina/estreptomicina.

Además de las líneas de AT/RTs utilizamos otras líneas celulares como HEK293 (ATCC, CRL-1573, línea celular humana de riñón fetal), A549 (ATCC CCL-185, carcinoma de pulmón) y U-87 MG (ATCC, HTB-14, glioblastoma) que se cultivaron siguiendo las indicaciones de la ATCC. Los astrocitos humanos normales (NHA; Lonza #CC-2565) se cultivaron en medio ABM Basal (Lonza #CC-3187) suplementado con AGM SingleQuots Supplements (Lonza #CC-4123). Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37 °C con 5% de CO₂ en atmósfera, así como libres de micoplasma, confirmado por el test Mycoalert mycoplasma detection kit (Lonza #LT07-418). También se confirmó su autenticidad realizando su perfil de DNA (STR *Short Tandem Repeat*) en CIMA Lab Diagnostic de Pamplona.

1.2 Amplificación del virus

Delta-24-RGD y Delta-24-RGD/GFP se amplificaron en cultivo de A549 y se purificaron mediante ultracentrifugación en gradiente doble de CsCl. Las partículas

adenovirales totales se determinaron por OD₂₆₀ nm¹¹⁶, y las partículas infecciosas se titularon mediante diluciones seriadas en cultivos HEK293 por tinción de hexones¹¹⁷.

1.3 Caracterización de la expresión de SMARCB1

1.3.1 Extracción y medición de proteínas celulares

Para la extracción de proteínas recogimos 1×10^6 células de cada línea celular. Todos los pellets se lisaron añadiendo 50 μ L de buffer de lisis (1x PBS, 1% tritón X-100, 1X inhibidores de proteasa, Roche Diagnostic) e incubados en hielo durante 30 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 1800 rpm a 4 °C durante 15 minutos y el sobrenadante se recogió en un nuevo tubo de 1,5 mL. Medimos la concentración de proteínas utilizando el Protein Assay Dye Reagent (Bio-Rad Laboratories #5000006) basado en el método de Bradford. Realizamos una curva patrón utilizando BSA. Las absorbancias de las muestras se midieron a 495 nm en el lector de absorbancias Spectrostar^{Nano}, BMG Labtech. Una vez cuantificadas las muestras, desnaturalizamos 30 μ g de proteína de cada línea celular a 95 °C durante 5 minutos en buffer 4X NuPAGE LDS Sample buffer (Invitrogen #NP0007).

1.3.2 Western blot

La separación de las proteínas se realizó por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-Tris-glicina del 10%) por el método de Laemmli²⁴ utilizando el sistema *Mini-Protein III* (Bio-Rad). Tras la electroforesis, se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa utilizando el dispositivo *Mini-Transblot* de Bio-Rad durante 1 hora y 15 minutos a 110 v, tiñendo posteriormente la membrana con rojo Ponceau S (Sigma #P7170) para confirmar la correcta transferencia de las proteínas. La membrana se bloqueó durante una hora a temperatura ambiente con leche desnatada en polvo al 5% en PBS-0,1% Tween-20 y luego incubamos durante toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios correspondientes; en este caso, con anti-SMARCB1/BAF47 (1:1000, Cell Signaling Technology #91735) y anti- β Tubulina 2.1 (1:1000, Merck #AB9354). Tras lavar las membranas 3 veces durante 10 minutos añadimos los anticuerpos secundarios, Anti-IgG de ratón-HRP (1:10.000, Promega #7076P2) y Anti-IgG de conejo-HRP (1:10.000, Promega #7074P2). La visualización de las bandas se realizó por quimioluminiscencia (Roche #12015196001) usando el sistema de análisis de imagen Chemidoc MP de Bio-Rad.

1.4 Análisis de aberraciones genéticas

Para caracterizar las aberraciones genéticas en nuestras tres líneas celulares remitimos las muestras al servicio Cima Lab Diagnostics. A partir de un pellet con aproximadamente 1×10^6 de células por medio de Maxwell 16 MDx Instrument AS3000 (Promega) se extraen DNA y RNA (Maxwell 16 FFPE Plus LEV DNA Purification Kit (AS1135) y Maxwell 16 LEV RNA FFPE Purification Kit (AS1260)). Para la cuantificación y valoración de la calidad de la extracción se utilizó el Fluorímetro Qubit 2.0. A partir de los ácidos nucleicos extraídos se analizaron algunas de las alteraciones genéticas más relevantes en tumores pediátricos mediante un panel de NGS (*Next Generation Sequencing*) llamado OncoPrint Childhood Cancer Research Assay (Thermo Fisher Scientific). El panel OncoPrint Childhood incluye alteraciones relevantes para tumores pediátricos: 82 mutaciones puntuales, 44 secuencias codificantes completas, 24 cambios de número de copia (CNVs), 90 reordenamientos (translocaciones/fusiones) y cambios en la expresión de determinados genes.

Las librerías de amplicones se prepararon con el sistema Ion Chef antes de la secuenciación Ion GeneStudio S5 (Thermo Fisher Scientific). Los datos de secuenciación se importaron y analizaron con el software Ion Reporter (IR) v5.0 (Thermo Fisher Scientific). El IR pipeline es un software propio desarrollado por Thermo Fisher Scientific para optimizar la tecnología Ion Torrent. La línea de producción utiliza Torrent Variant Caller y el genoma de referencia hg19 para la llamada de variantes. Se realizó un análisis de datos basado en el software de Thermo Fisher, tanto manual como automatizado, para abordar el filtrado y la interpretación de variantes. La herramienta de visualización, Integrative Genomics Viewer, se utilizó para apoyar los datos NGS y las anotaciones genómicas. Las variantes con menos de 500 recuentos de lecturas o una frecuencia de variantes inferior al 5% no se tuvieron en cuenta.

1.5 Análisis de receptores virales en las líneas celulares

El análisis de los receptores adenovirales en la superficie de las células de nuestras líneas celulares se realizó por citometría de flujo. Las células muertas se descartaron utilizando el marcador de muerte eFluor660 (Invitrogen #65-086474) en una dilución 1:1000 sobre 2,5 millones de células y las incubamos durante 30 minutos en hielo y en oscuridad. Pasado el tiempo de incubación, lavamos las células con buffer BAM (PBS,

5% BSA y de 2.5 mM de EDTA) y se dividieron en tubos de citometría (500.000 células por tubo) para realizar el marcaje con los siguientes anticuerpos monoclonales primarios: anti-CAR (Merck #05-644), anti-integrina $\alpha_v\beta_3$ (Merck #CBL544) y anti-integrina $\alpha_v\beta_5$ (R&D Systems #MAB2528), todos ellos añadidos a una dilución 1:100. Se incuban durante media hora en las mismas condiciones anteriores. Lavamos con buffer BAM y centrifugamos a 1.500 rpm durante 3 minutos y añadimos el anticuerpo secundario anti-mouse IgG1-PE-Vio770 (Miltenyi #130-099-062) en una dilución 1:200. Tras la incubación del anticuerpo secundario las muestras se vuelven a lavar para eliminar el exceso de anticuerpo. Por último, fijamos las células con 100 μ L de Cytofix (BD #554655) durante 10 minutos en frío y oscuridad. Tras un lavado, las células se resuspendieron en 100 μ L de buffer BAM. En este punto las muestras ya están preparadas para analizar en el citómetro FACSCanto II system (BD Biosciences) con el software FACSDiva (BD Biosciences). Para el análisis de los datos obtenidos en la citometría, se utilizó el programa FlowJo V.10 de BD Biosciences.

A partir de datos de secuenciación masiva (número de acceso GSE70678) se analizaron la expresión relativa de las integrinas α_v , β_3 , β_5 y del receptor CAR en muestras de AT/RTs respecto a los cerebros normales (estudio *in silico*). Estos datos se normalizaron utilizando una estadística de resumen denominada análisis robusto de matrices múltiples a escala logarítmica (RMA)¹¹⁸. En primer lugar, se realizó un proceso de filtrado con R/Bioconductor¹¹⁹ y los genes con niveles de expresión inferiores a la señal de ruido, ocurre en más del 50% de las muestras estudiadas (cerebros normales y AT/RTs), fueron considerados como no expresados. A continuación, se calculó la abundancia de expresión relativa para cada gen mediante la normalización de la expresión génica con una media de 0 y una desviación estándar de 1.

1.6 Análisis de la infectividad por citometría de flujo

Para poder confirmar que las tres líneas celulares de AT/RT pueden ser infectadas por el adenovirus Delta-24-RGD se utilizó el adenovirus AdGFP-Delta-24-RGD, un adenovirus que expresa la proteína GFP. Esto nos permite cuantificar la cantidad de células infectadas ya que emitirán fluorescencia tras la excitación con un láser de 488nm. Para ello, sembramos en una placa de 6 pocillos 175.000 células y al día siguiente infectamos a diferentes dosis con el AdGFP-Delta-24-RGD (0, 0'1, 1, 10, 100

PFUs/célula). Pasadas 48 horas, se recogieron las células y se resuspendieron en 200 μ L de PBS. Posteriormente, analizamos las muestras en el citómetro FACSCantoII system (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) con el software FACSDiva (BD Biosciences). Los porcentajes de las células positivas fueron calculados utilizando el programa FlowJo V.10 (BD Biosciences) y representados por medio del programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software). Este ensayo se realizó por triplicado.

1.7 Medición de la actividad del factor de transcripción E2F1

Se sembraron 300.000 células en una placa de 24 pocillos tanto de la línea de astrocitos humanos normales (NHA), como de las líneas de AT/RT, CHLA-06 y CHLA-266, Posteriormente se transfectaron 250ng de plásmido E2F1-Luc que expresa la luciferasa de luciérnaga bajo el control de un promotor que responde a E2F1118. A continuación, se transfectaron 250 ng de pRL-CMV, como control de transfección, ya que expresa constitutivamente luciferasa de Renilla (Promega #E2261), A las 24 h, se midieron las actividades de luciferasa y Renillos dos reporteros utilizando un sistema de ensayo de luciferasa dual según las instrucciones del fabricante (Promega #E1910).

1.8 Detección de proteínas virales

Para cuantificar la expresión de proteínas virales tras la infección, sembramos 200.000 células de cada línea celular en una placa de 6 pocillos. Al día siguiente se infectaron las células con dosis crecientes del virus Delta-24-RGD: 0, 5, 10, 25, 50 PFUs/célula. Se sembraron dos pocillos a MOI de 50, ya que uno lo recogimos a las 16 horas, antes del comienzo del primer ciclo viral. El resto de los pocillos se recogieron a las 48 horas cuando se ha completado al menos un ciclo viral. Tras la recolección de todas las muestras se centrifugaron a 800g durante 5 minutos para conseguir el pellet y realizar la extracción de proteína. Una vez cuantificadas las proteínas realizamos un Western blot para la detección de dos proteínas virales: E1A (1:1.000, Santa Cruz #Sc-430) y fibra (1:1.000, Novus Biologicals #NB600-541). Como proteína constitutiva utilizamos Grb-2 (1:1.000, BD Transduction Laboratories #610112).

1.9 Replicación viral

Para evaluar la replicación viral en las diferentes líneas celulares sembramos 5×10^5 células en placas de 6 pocillos y, 24 horas más tarde, se infectaron con una sola dosis de 10 PFUs/célula de adenovirus Delta-24-RGD. Las muestras se recolectaron en dos

tiempos distintos: a 16 horas (antes de la replicación del adenovirus) y a las 72 horas. Una vez recogidas todas las muestras, se lisaron las células mediante 3 ciclos de congelación y descongelación (-80 °C y 37 °C). Las muestras se centrifugaron a 1.500 rpm durante 5 minutos para eliminar todos los restos celulares. A partir de este lisado stock, se realizaron 10 diluciones seriadas con medio DMEM sin suplementar. En una placa de 96 pocillos de fondo plano se añadieron 100 µL de cada dilución por triplicado y, sobre ellos, se añadieron 50 µL DMEM completo con una concentración de 2.000 células/µL de HEK293. La placa se incubó durante 36 horas a 37 °C y 5% de CO₂, tiempo tras el cual, el sobrenadante fue desechado y las células se fijaron con metanol frío.

El cálculo de PFUs se determinó por inmunofluorescencia mediante el recuento de células FITC positivas debida al marcaje de la proteína adenoviral hexón¹²⁰. El contaje se realizó en los pocillos de las diferentes diluciones bajo el microscopio de fluorescencia (Zeiss Imager MP).

Con los resultados aplicamos la siguiente fórmula:

$$PFU/mL = \text{Número de células FITC positivas} \times \text{dilución del pocillo contado} \times 10$$

Para obtener una cuantificación fiable, contamos los pocillos de dos diluciones seriadas. El experimento se realizó por triplicado.

1.10 Efecto oncolítico del virus

Para estudiar el efecto citopático producido por el adenovirus realizamos un ensayo de viabilidad celular utilizando el kit CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega #G3581)¹²¹. Es un método colorimétrico basado en la escisión, por parte de las células metabólicamente activas (producen metabolitos NADH o NADPH), de la sal de color amarilla de tetrazolio (MTS[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) en cristales púrpura de formazán. Estos cristales se solubilizan y la solución coloreada resultante se cuantifica mediante un espectrofotómetro (lector ELISA).

Primero realizamos un estudio cinético de cada línea, necesario para concretar el número de células adecuado para una confluencia celular óptima (pocillo control debe medir entre 1,2 y 0,8 de absorbancia) a los 3 y 5 días después de su sembrado. El número de células por pocillo (para una placa de 96 pocillos) para las líneas BT-12,

CHLA-06 y CHLA-266 fue 2.000, 6.000 y 15.000 células respectivamente. 24 horas post-cultivo, las células fueron infectadas con una serie de dosis crecientes de adenovirus, entre 0 a 50 PFUs/célula. La viabilidad fue medida a los 3 y 5 días con el kit. Las curvas de dosis-respuesta fueron analizadas utilizando el programa GraphPad Prims 8, calculando también, las IC₅₀, es decir, la dosis de Delta-24-RGD a la cual mueren la mitad de las células tanto a 3 días como a 5.

1.11 Estudio de muerte inmunogénica

1.11.1 Preparación de las muestras para detección de Hsp90, HMGB1 y ATP

Para evaluar la expresión de los patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) producidas por las células tras la infección, sembramos por triplicado 2x10⁵ células por pocillo de cada línea celular en placas de 6 pocillos. 24 horas más tarde, la mitad de los pocillos, fueron tratados con el adenovirus a la dosis correspondiente a la IC₅₀ de los tres días calculada anteriormente. Todos los sobrenadantes fueron recogidos 72 horas más tarde.

1.11.2 ELISA de Hsp90 y HMGB1

Para la detección y cuantificación de Hsp90α y HGMB1 sobre los sobrenadantes de las muestras recogidas, utilizamos el kit ADI-EKS-895 de Enzo Life Sciences Inc. y el kit con referencia #ST51011 de IBL International, respectivamente. Todos los procedimientos se realizaron siguiendo el protocolo de la casa comercial. Las muestras, en el caso de la Hsp90α, se diluyeron 10 veces para evitar la saturación. La quimioluminiscencia se midió por espectrofotometría usando el lector de placas Tecan's Sunrise con el software Magellan.

1.11.3 Medición de ATP

Para cuantificar la variación de ATP en el sobrenadante utilizamos el kit ENLITEN ATP Assay System #FF2000 de Promega siguiendo el protocolo. El ensayo utiliza luciferasa recombinante para catalizar la siguiente reacción, donde la intensidad de la luz emitida es proporcional a la concentración de ATP:



La luz se ha medido a 560 nm con el luminómetro FLUOstar OPTIMA de BMG Labtech, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de ATP presente en la muestra.

1.11.4 Detección de calreticulina en membrana

Para la detección de la translocación de la proteína del retículo endoplasmático a la membrana celular, realizamos una inmunofluorescencia. Para ello, sembramos 2×10^5 células sobre un porta y a las 24 horas se infectaron con el adenovirus a la dosis correspondiente al IC_{50} de tres días. En el caso del control se añadió PBS. A las 4 horas post-infección, las células se fijaron durante 15 minutos a $37^\circ C$ con 4% formaldehído libre de metanol (Thermo Fisher Scientific #28906). Las membranas de las células se tñieron con $1 \mu g/mL$ de aglutinina de germen de trigo (WGA) (Thermo Fisher Scientific #W11261) conjugada con AlexaFluor488 siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Posteriormente, las muestras se bloquearon con el reactivo *antibody diluent* (Dako #S0809) durante 30 minutos a temperatura ambiente y después se añadió a una dilución 1:250 el anticuerpo de la CRT (Abcam #ab2907) incubándolas durante una hora a la misma temperatura. Como anticuerpo secundario, utilizamos AlexaFluor594 a una dilución 1:500 durante 30 minutos, también a temperatura ambiente. Por último, se utilizó DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole) (Biohum #40009) a una dilución 1:400 como marcador de núcleos celulares. Las imágenes de inmunofluorescencia se tomaron con el microscopio de fluorescencia Zeiss Image MP (Oberkochen, GE) con el programa Zeiss-Pro.

1.12 Establecimiento de la línea celular BT-12 con Luc/GFP

El plásmido MSCV-Luc-IRES-GFP (Addgene) y la mezcla de empaquetamiento Trans-lentiviral GIP7 Packing System (Open System #TLP4614) se transfectaron en la línea HEK-293-T (ATCC #CRL-3216) por medio de Fugene (Promega #E2311). 48 horas post-transfección se recogieron los sobrenadantes y se centrifugaron a 1.200 rpm durante 5 minutos. Posteriormente se purificaron con un filtro de acetato de celulosa de $22 \mu m$.

Para realizar la infección de la línea BT-12, se sembraron 200.000 células y, al día siguiente, se añadieron $300 \mu L$ del sobrenadante con los lentivirus junto con $8 \mu g/mL$ de polibreno (Millipore #TR-1003-G). A las 48 horas verificamos la infección observando las células en un microscopio de fluorescencia y, además, cuantificamos la expresión de GFP por citometría de flujo. Como la expresión de GFP en las células era menor del 90%, se realizó un *sorting* (BD FACSAria™ IIu) para aislar únicamente las células GFP positivas.

1.13 Estudio anatomopatológico

Para la realización de las diferentes técnicas de detección de anticuerpos y proteínas, las muestras deben estar incluidas en parafina. Para ello, lo primero que hacemos tras el sacrificio del ratón, es extraer el cerebro y fijarlo en formol 3,9% (Panreac #2529311315) durante 24 horas, tras las cuales, se deshidrata en etanol al 70%. Las muestras ya se encuentran en condiciones de incluirse en parafina. Para que en los futuros cortes de parafinas aparezcan las zonas deseables para su estudio, es necesario que la muestra se incluya en una posición óptima. En el caso del modelo supratentorial y diseminado, el corte debe hacerse en el plano coronal y para los modelos infratentorial en el sagital.

1.13.1 Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica (IHC) es el método empleado con más frecuencia para la detección de diferentes antígenos en los tejidos. Para los estudios histológicos se realizaron cortes de 4 µm de espesor de los bloques de parafina usando el microtomo Microm HM 340E (ThermoFisher Scientific, Waltham). Los portas se sumergieron en xileno y se rehidrataron tratándolos con una serie gradual de etanol. Para la exposición de antígenos, las muestras se tratan en un PT-Link (Dako) con citrato pH=6 o Tris-EDTA pH=9, dependiendo de los anticuerpos a utilizar. La peroxidasa endógena se bloquea tras incubar los portas durante 30 minutos en metanol al 3% H₂O₂. Las muestras ya se encuentran preparadas para las incubaciones con los anticuerpos primarios: anti-hexon (1:2.000 Merck Millipore #AB1056), anti-E1A (1:1.000, Santa Cruz Biotechnology #sc-430), anti-CD3 (1:300, Thermo Fisher Scientific #RM9107), anti-Iba-1 (1:4.000, Wako #019-19741,.) and anti-GFP (1:1.000, Abcam #ab6556,); y secundarios: anti-IgG de ratón (1:10.000, Cell Signaling #7076) y anti-IgG de conejo (1:10.000, Promega #7074). Para terminar, las preparaciones se revelan con DAB (3,3-diaminobencine, Dako #K346889-26) y se realiza una tinción de contraste con hematoxilina de Harris (MERCK #HX85602653). Las preparaciones se observaron bajo el microscopio Nikon Y-THS 0114107 y los resultados fueron escaneadas con el dispositivo de captura de imagen Aperio C52 (Leica Microsystems) y Aperio ImageScope 12.1.0 software (Leica Microsystems).

Para la detección de presencia tumoral se realizaron tinción con hematoxilina-eosina (HE). Este método supone la aplicación de la tinción de hematoxilina, que por ser básica, tiñe estructuras ácidas en tonos azul y púrpura, como los núcleos celulares y la

eosina tiñe componentes básicos en tonos de color rosa, gracias a su naturaleza ácida, como es el caso del citoplasma. Debido a la alta densidad celular existente en la masa tumoral, ésta aparecerá en color púrpura en contraste con la zona rosa correspondiente al tejido sano.

1.13.2 Inmunofluorescencia Multiplex

Una vez que las preparaciones a estudiar han sido desparafinadas, fijadas y tratadas para exponer los antígenos, se realizó un bloqueo de proteínas con suero de cabra (Dako #G9023) al 20% en PBS. Posteriormente se procedió a la incubación con los anticuerpos primarios, anticuerpos secundarios biotinilados y con estreptavidina-HRP (Dako) seguido por visualización TSA con fluoróforos Opal 520, Opal 540, Opal 570, Opal 620, Opal 650, y Opal 690 (Akoya Biosciences) diluidos en 1X Plus Amplification Diluent (Akoya Biosciences)¹²². Los anticuerpos primarios fueron: CD11b (monoclonal de conejo; clon EPR1344; 1:1000; Abcam #ab133357), CD68 (monoclonal de ratón; clon PG-M1; listo para usar; Agilent #IR613), CD3 (IgG policlonal de conejo; Agilent #IR503), CD8 (monoclonal de ratón; clon C8/144B; listo para usar; Agilent #GA62361-2), CD20 (monoclonal de ratón; IgG2 α ; clon L26; Agilent #GA604). Después de las cinco reacciones secuenciales, los núcleos se tiñeron con DAPI espectral (Akoya Biosciences) y las secciones se montaron con Faramount Aqueous Mounting Medium (Dako).

1.13.3 Imágenes de tejidos, deconvolución espectral y fenotipado

Los portaobjetos inmunofluorescentes multiplexados se escanearon en un sistema automatizado de obtención de imágenes patológicas cuantitativas Vectra-Polaris (Akoya Biosciences)^{122,123}. Todo el tejido presente en una única sección de tejido FFPE se visualizó, se hizo la deconvolución y se exportó como archivo de imagen TIF de componentes utilizando el software Inform de Akoya Biosciences (versión 2.4.8). Los mosaicos de imágenes TIF de los componentes se importaron en el software de patología digital de código abierto, QuPath versión 0.2.0-m9, y se unieron utilizando las coordenadas x-y para crear un nuevo archivo TIF piramidal para el análisis de imágenes. El análisis de las imágenes se realizó en toda la sección de tejido y se refirió al área total del tumor, al área central del tumor y al área del margen invasivo. El margen invasivo se definió como una región de 500 μm de ancho en la interfaz entre el tejido normal del huésped y el borde del tumor invasor (determinado por el marcador celular, CD11b).

La segmentación celular se realizó en toda la imagen multispectral utilizando el software QuPath versión 0.2.0-m9. La detección nuclear se llevó a cabo en el canal DAPI utilizando un algoritmo de cuenca personalizado y no supervisado¹²³. Se generó un clasificador de algoritmo de árbol aleatorio para subclasificar las células como CD11b+, CD68+, CD3+, CD8+ y CD20+. Los clasificadores del algoritmo celular se analizaron por separado para cada marcador celular utilizando las características generadas, haciendo que un patólogo experimentado anotara regiones en un subconjunto de imágenes obtenidas de todos los casos utilizados en este estudio, con retroalimentación interactiva sobre el rendimiento de la clasificación proporcionada durante el análisis en forma de imágenes de marcado. Se eliminaron las células cercanas al borde de las imágenes para reducir el riesgo de artefactos.

1.14 Fenotipado de linfocitos T

Por medio de citometría de flujo se determinaron los fenotipos de las células T activados/exhaustos en bazos, ganglios linfáticos cervicales y los linfocitos infiltrantes de tumor (*TILs*) a los 15 días después del tratamiento con Delta-24-RGD.

Los esplenocitos totales se obtuvieron por disgregación mecánica de los bazos a través de un filtro de 40 µm (Falcon #352340). Las muestras se centrifugaron y se sometieron a lisis eritrocitaria mediante la incubación de los pellets celulares con 3 mL de ACK (Gibco #A10492-01) durante 5 min. Finalmente, las muestras se centrifugaron y se resuspendieron en tampón FACS para la tinción. Se realizó el mismo protocolo para los ganglios linfáticos cervicales, con la excepción de la lisis con ACK. Los ganglios linfáticos de ambos lados (ipsilateral y contralateral al lugar de inyección del tumor) se procesaron como una sola muestra.

Los *TIL* se obtuvieron de muestras de tumores cerebrales y se incubaron durante 15 minutos en agitación en 2 mL de DMEM con 5 mg/mL de colagenasa (Gibco #17-018-029) a 37 °C. A continuación, se añadió DNAsa I (Roche #11-284-932-001) a una concentración final de 10 µg/mL y las muestras se disgregaron mecánicamente y se incubaron durante 10 minutos más a 37 °C. A continuación, se volvieron a disgregar mecánicamente e incubaron 10 minutos más a 37 °C. Transcurrido el tiempo, las muestras se pasaron por un filtro de 40 µm, se añadieron 10 mL de HBSS (Gibco #14175-053) y se centrifugaron a 450×g (5 min a 4 °C). El pellet se resuspendió en 12 mL de HBSS que contenía 30% de Percoll (GE Healthcare #17-0891-02) y 10% de FBS y se

centrifugó durante 15 minutos a 800×g (4 °C). Las muestras se lavaron con 10 mL de HBSS y se centrifugaron durante 5 minutos a 450×g (4 °C). Los pellets se resuspendieron en 3 mL de tampón ACK para eliminar los eritrocitos. Finalmente, las muestras se centrifugaron y se resuspendieron en tampón FACS para la tinción.

Las muestras se marcaron para citometría de flujo con anticuerpos contra CD3 (1:67; BD Biosciences #641415), CD4 (1:1000; EPR19514, Abcam #ab183685) CD8 (1:100; BD Biosciences # 341050), CD137 (1:20; BD Biosciences #550890), PD1 (1:20; BD Biosciences #A78885), TIGIT (1:100; Biolegend #372709;) y TIM3 (1:20; Biolegend #345029).

2. ESTUDIOS IN VIVO

Todos los protocolos de experimentos animales han sido revisados y aprobados por el Comité de Bioética del Gobierno de Navarra y por el departamento de Ética para la experimentación animal de la Universidad de Navarra (CEEA).

2.1 Sistema de “guide-screw”

Para todos los modelos ortotópicos de tumores cerebrales realizados en este trabajo se ha utilizado el sistema de “guide-screw” desarrollado por el Dr. Fred Lang en el año 2000¹²⁴, con el que se evita la utilización de estereotaxia.

El método consiste en la colocación de un tornillo guía o *bolt* (perno) en las coordenadas exactas, correspondientes a la localización de implantación del tumor. Este sistema permite administrar no solo células, sino también cualquier tipo de quimioterapia intratumoral, anticuerpos o, como en este caso, el tratamiento con adenovirus oncolíticos.

El tornillo guía (Plastics One #C212SG) tiene una longitud de 2,5 mm y posee un orificio central de 0,5 mm a través del cual colocaremos una jeringa Hamilton (Fisher Scientific #87900) con una aguja de calibre 26G/51mm/pst2 a la que hemos añadido un tope que nos permitirá decidir la profundidad a la que queremos actuar.

Para la implantación, tanto de las células como del adenovirus, utilizamos una bomba de infusión (PHD 2000 *Infusion syringe pump multiple syringe holder* de Harvard Apparatus) la cual permite trabajar hasta con 10 animales a la vez, facilitando y agilizando el uso de un número alto de ratones por experimento.

2.1.1 Implantación del bolt

Los animales se anestesiaron, bajo condiciones de esterilidad, mediante una inyección intraperitoneal de una solución de ketamina (Imalgene)/xylazine (Rompun 2% Bayer) (100 mg ketamina y 10 mg xylazine / kg ratón). Antes de empezar la cirugía, al ratón se le administra una dosis de buprenorfina (Buprex #961425) como analgésico, repitiéndose esta aplicación las 24 horas post-cirugía.

Tras la aplicación de povidona yodada en la cabeza del ratón, se realiza una incisión de unos 5 mm de longitud mediante un bisturí, en la zona donde se quiere implantar el *bolt*. Una vez localizadas las coordenadas, se realiza un orificio en el cráneo, por medio de un pequeño taladro de 1 mm de diámetro (Plastics One Drill HSS #8J60) en el cual atornillaremos el *bolt* ayudándonos de un destornillador especial (Plastics One Screwdriver SD#1) (**Figura 1A**).

Las coordenadas de implantación del *bolt* varían de un modelo a otro (descritos en el siguiente capítulo). En el caso del modelo supratentorial las células las implantamos en el cuerpo estriado, en el modelo infratentorial en el interior del cerebelo y en el caso del modelo diseminado utilizamos las coordenadas descritas por Studebaker *et al.*⁸⁴ donde la implantación se lleva a cabo en el interior del ventrículo lateral derecho (**Figura 1B**).

2.1.2 Implantación de células y Delta-24-RGD

Una vez colocado el tornillo en el lugar correspondiente según el modelo a seguir, cargamos las jeringas de Hamilton con 3 μ L de suspensión celular con el número de células determinado tras la cinética. Con el animal anestesiado, introducimos la aguja de la jeringa por el orificio del *bolt* con el tope colocado a la profundidad deseada. Se colocan las jeringas sobre la bomba de infusión y se programa para introducir la suspensión a una velocidad de 0,25 μ L/minuto (**Figura 1C**). La administración del tratamiento seguiría el mismo esquema. Una vez terminada la infusión, las Hamilton permanecen 5 minutos más para evitar al máximo el reflujo de la muestra. Tras este tiempo, las jeringas se retiran lentamente y se procede a cerrar la herida por medio de un pegamento especial de sutura, llamado Hystoacryl (Braun Surgical #1050044). Los animales se despiertan en condiciones de calor (bajo la manta eléctrica).

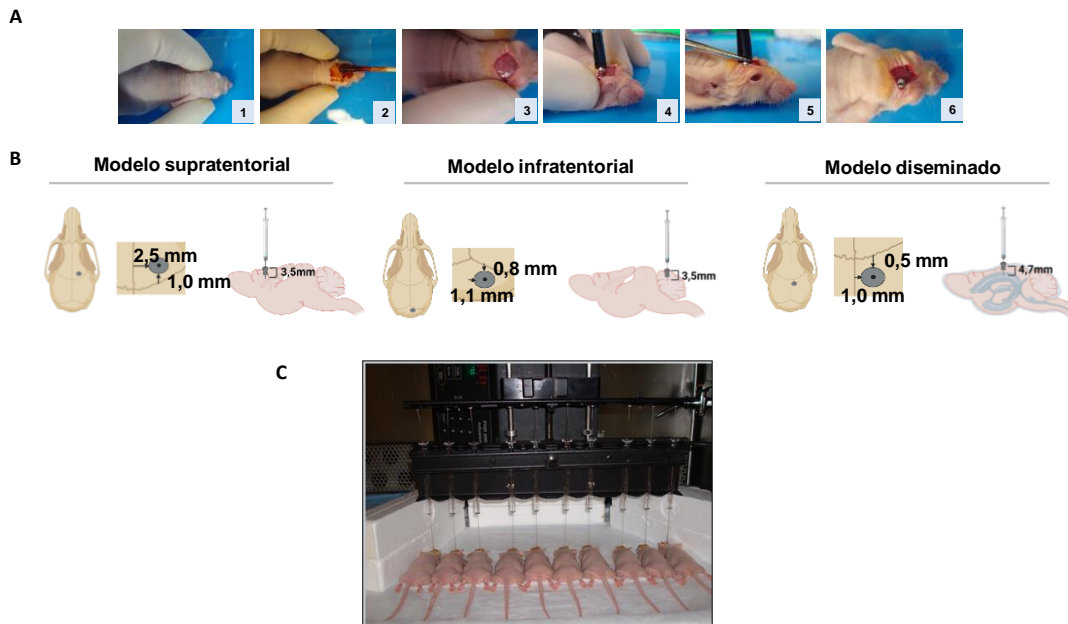


Figura 1. (A) Imágenes de la implantación del *bolt*. 1) Sujeción del animal 2) desinfección con povidona 3) incisión en la zona deseada 4) atornillamiento del *bolt* 5) separación del *bolt* del destornillador 6) resultado tras la implantación. (B) Coordenadas de colocación del *bolt* en los tres modelos animales (C) Imagen de la implantación de las células en 10 ratones con la bomba de perfusión.

2.2 Generación de modelos in vivo

Para los modelos inmunodeprimidos utilizamos ratones Balb/c-Rag2tFwa-II2rg (RAG-2) de entre 4 y 6 semanas de vida, protocolo ético 063C-17.

2.2.1 Modelo supratentorial

Las coordenadas de colocación del *bolt* para este modelo serían con referencia a bregma: **2,5 mm lateral, 1,0 mm craneal y 2,0 mm de profundidad (3,5 mm contando la altura del *bolt*).**

Realizamos una cinética de las tres líneas celulares para decidir cuál era el número óptimo de células para realizar posteriormente los estudios de supervivencia.

BT-12: 250.000 cls / 500.000 cls / 1×10^6 cls

CHLA-06: 250.000 cls / 500.000 cls / 1×10^6 cls

CHLA-266: 1×10^6 cls / 2×10^6 cls

2.2.2 Modelo infratentorial

Las coordenadas de colocación del *bolt* para este modelo serían con referencia a lambda: **1,1 mm lateral, 0,8 mm posterior y 2,0 mm de profundidad (3,5 mm contando la altura del *bolt*).**

BT-12: 250.000 cls / 500.000 cls / 1×10^6 cls

CHLA-06: 500.000 cls / 1×10^6 cls

CHLA-266: 500.000 cls / 1×10^6 cls / 2×10^6 cls

2.2.3 Modelo diseminado

En este caso, sólo utilizamos una línea celular, BT-12-GFP/luc. El *bolt* se coloca en el ventrículo lateral derecho a **1,0 mm lateral, 0,5 mm posterior y 3,2 mm de profundidad (4,7 mm contando la altura del *bolt*)** desde bregma.

Para confirmar que las coordenadas eran las idóneas, primero realizamos una prueba con tinta china. Siendo la localización deseada, se implantaron 500.000 células de la línea de ATRT BT-12-GFP/luc.

Una vez implantadas las células y el tratamiento, se realizó un seguimiento de la localización y tamaño tumoral por medio de luminiscencia. Para ello, tras anestesiarse al ratón, inyectamos intraperitonealmente 2 mg de *Beetle Luciferin Potassium Salt* (Promega #E160A) y 5 minutos más tarde la señal de luminiscencia es revelada en el PhotonIMAGER TM OPTIMA y cuantificada usando ImarisSoftware.

2.3 Experimentos de supervivencia en modelos inmunodeprimidos

Una vez definido el número de células que era el adecuado para cada línea celular y modelo, se realizaron los siguientes experimentos de supervivencia donde siempre se siguió el mismo patrón: 3 días antes de la implantación de las células se coloca el *bolt*, y 4 días más tarde se realiza el tratamiento con el adenovirus Delta-24-RGD a 1×10^7 o 1×10^8 PFUs/ratón (**Figura 2**).

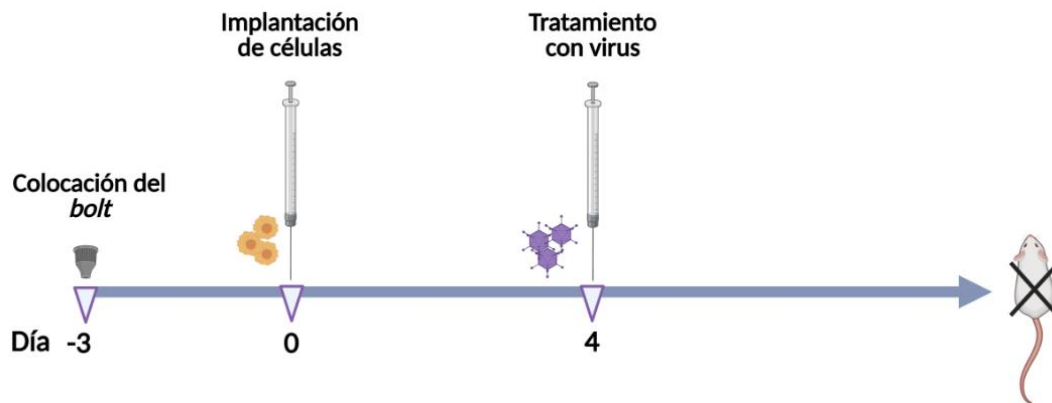


Figura 2. Representación del patrón seguido en los experimentos de supervivencia.

2.3.1 Modelo supratentorial

Para este modelo se implantaron 2×10^6 de células de la línea CHLA-266 y los ratones a los 4 días fueron tratados con 1×10^7 PFUs/ratón o en el caso de los controles, PBS. Tanto las células como los adenovirus en un volumen máximo de $3 \mu\text{L}$.

2.3.2 Modelo infratentorial

Debido a que la mayoría de los tumores en los pacientes aparecen en la parte infratentorial del SNC, decidimos realizar los experimentos con las tres líneas de AT/RT. Basado en el estudio de cinética del tumor implantamos 500.000 células de cada línea en $3 \mu\text{L}$ de volumen y tratamos 4 días más tarde a los ratones con dos dosis diferentes de Delta-24-RGD: 1×10^7 y 1×10^8 PFUs/ratón.

2.3.3 Modelo diseminado

Se implantaron 1×10^6 de células de BT-12-GFP/luc. Los tratamientos fueron iguales que en el caso del modelo infratentorial.

2.4 Experimentos de supervivencia en modelos inmunocompetentes

Para evaluar la respuesta inmune humana en un modelo xenograft, adquirimos ratones NSGTM-SGM3-hCD34+ (*NOD.CgPrkdcscidIl2rgtm1WjlTg (CMVIL3, CSF2, KITLG)1Eav/MloySzJ*) de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Todos los ratones eran hembras de 22 semanas y procedían del mismo donante fetal.

Implantamos 2×10^6 células de CHLA-06 en tejido estriado (supratentorial) y a los cuatro días los ratones fueron tratados con una única dosis (10^8 PFU/ratón) de Delta-24-RGD. Se realizó un seguimiento de peso para evaluar toxicidad del tratamiento.

Todos los animales estuvieron monitorizados diariamente y fueron sacrificados cuando presentaban los síntomas típicos de esta enfermedad, como una posición encorvada, pérdida de peso, no reacción a estímulos, etc. Añadir, que todos los estudios animales fueron desarrollados en los animalarios del Centro de Investigación Biomédica (CIMA) siguiendo las normas de la institución, las leyes regionales y nacionales (protocolos éticos CEEA/091-18 y CEEA/066-18) y acorde a las directrices éticas para el cuidado de animales de experimentación.

3. ESTADÍSTICA

Los datos están representados como la media \pm desviación estándar de las tres réplicas biológicas y se han comparado usando el t-test de Student. Los análisis de múltiples comparaciones se han calculado usando los tests de ANOVA y Bonferroni. Se consideraron los valores de p significativos cuando $p \leq 0,05$ (* $\leq 0,05$, ** $\leq 0,01$ *** $\leq 0,001$ and **** $\leq 0,0001$). La proporción de supervivencia fue calculada mediante el método Kaplan-Meier y para los análisis estadísticos se empleó el test log-Rank. El programa utilizado para el análisis estadístico fue GraphPad Prism Software (GraphPad Software, San Diego, CA).

RESULTADOS

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE LOS MODELOS DE AT/RT

Al iniciar este trabajo de tesis no disponíamos de modelos de AT/RT en nuestro laboratorio, ya que aún no se había abierto ninguna línea de investigación para esta enfermedad. Así que el primer paso fue recopilar una batería de líneas celulares de AT/RT y caracterizar su idoneidad como modelos tumorales para nuestros experimentos. La gran mayoría las obtuvimos de repositorios como el *American Type Culture Collection* (ATCC; líneas CHLA-02, CHLA-04, CHLA-05 y CHLA-06) y el repositorio del *Children's Oncology Group* (COG; BT-12 y CHLA-266). También nos pusimos en contacto con el departamento de neurocirugía de la Universidad de Seúl, quienes habían desarrollado varias líneas celulares a partir de muestras de pacientes, cediéndonos las líneas AT/RT-08 y AT/RT-09. Tras el cultivo de las distintas líneas celulares de AT/RT, hemos podido comprobar que cada línea celular posee unas características morfológicas muy diferentes (**Figura 1.A**) y con unos tiempos de duplicación celular muy variados.

El diagnóstico diferencial de los AT/RTs requiere la confirmación de la pérdida de expresión de la proteína SMARCB1 (98%) o SMARCA4 (2%) en los tumores. En el caso de las líneas AT/RT-08 y 09 no teníamos información al respecto del estatus de estos genes. Por lo tanto, primero realizamos un Western blot para comprobar la expresión de SMARCB1 en estas líneas celulares. El resultado nos indica la ausencia de expresión de SMARCB1 en las líneas AT/RT-08 y AT/RT-09, al igual que en resto de líneas de AT/RT analizadas (**Figura 1.B**). Como controles positivos utilizamos proteína de las líneas NTERA-2 (carcinoma embrionario testicular) y U-87 MG (astrocitoma).

En líneas generales las células derivadas de tumores cerebrales pediátricos suelen ser difíciles de cultivar adecuadamente, y los AT/RT no son una excepción. En nuestro caso, el lento crecimiento en cultivo de las líneas celulares CHLA-02, CHLA-04, CHLA-05, AT/RT-08 y AT/RT-09 era incompatible con su aplicación a posteriori en los experimentos de eficiencia tumoral *in vivo* necesarios para el desarrollo de este trabajo. Por esta razón, decidimos centrar nuestro trabajo en las tres líneas de AT/RT que tenían una mejor cinética en cultivo que son BT-12, CHLA-06 y CHLA-266.

Una vez elegidos los modelos óptimos, decidimos ampliar su caracterización para saber qué otras aberraciones genéticas poseían. Para ello, se utilizó un panel de *Next Generation Sequencing* (NGS) llamados *Oncomine Childhood Cancer Research Assay* (*ThermoFisher*) basados en tecnología de captura que permite analizar 247 tipos de aberraciones con relevancia oncológica que incluyen: mutaciones puntuales (82), secuencias codificantes completas (44), cambio en el número de copias (CNVs) (24), reordenamientos (translocaciones/fusiones) (90) y cambios en la expresión en determinados genes (9). Los resultados obtenidos aparecen en la tabla de la **figura 1.C**, en donde se resalta en fondo azul los cambios correspondientes en el gen *SMARCB1*. En la línea BT-12 esta variación corresponde con una mutación puntual que da lugar a un desplazamiento del marco de lectura de la secuencia codificante de la proteína. Sin embargo, en la línea CHLA-06 y CHLA-266 se produce una pérdida total de una región del cromosoma 22q21.3 que incluye al gen *SMARCB1*. Tanto la mutación puntual como la pérdida del gen *SMARCB1* conllevan a la pérdida total de expresión de la proteína, como hemos podido comprobar por Western blot.

Los resultados del panel de NGS también nos indican que estas líneas celulares apenas desarrollan mutaciones o desórdenes genéticos recurrentes, comparándolos con los que aparecen en otros tipos de tumores como por ejemplo los gastrointestinales o pulmonares¹²⁵. Cabe destacar en la línea BT-12, la pérdida de *CDKN2A* y *CDKN2B* situados en 9q21.3, genes que codifican a p16^{INK4a} y p15^{INK4b}, respectivamente. Estas proteínas son inhibidoras de la actividad del complejo formado por CDK4/CDK6/ciclina D1, cuya función principal es bloquear la progresión del ciclo celular en la fase G1. La pérdida de *CDKN2A* supone la liberación de E2F por la hiperfosforilación constitutiva de Rb, produciéndose el paso a la fase S del ciclo celular por una alteración en la vía Rb/p16.

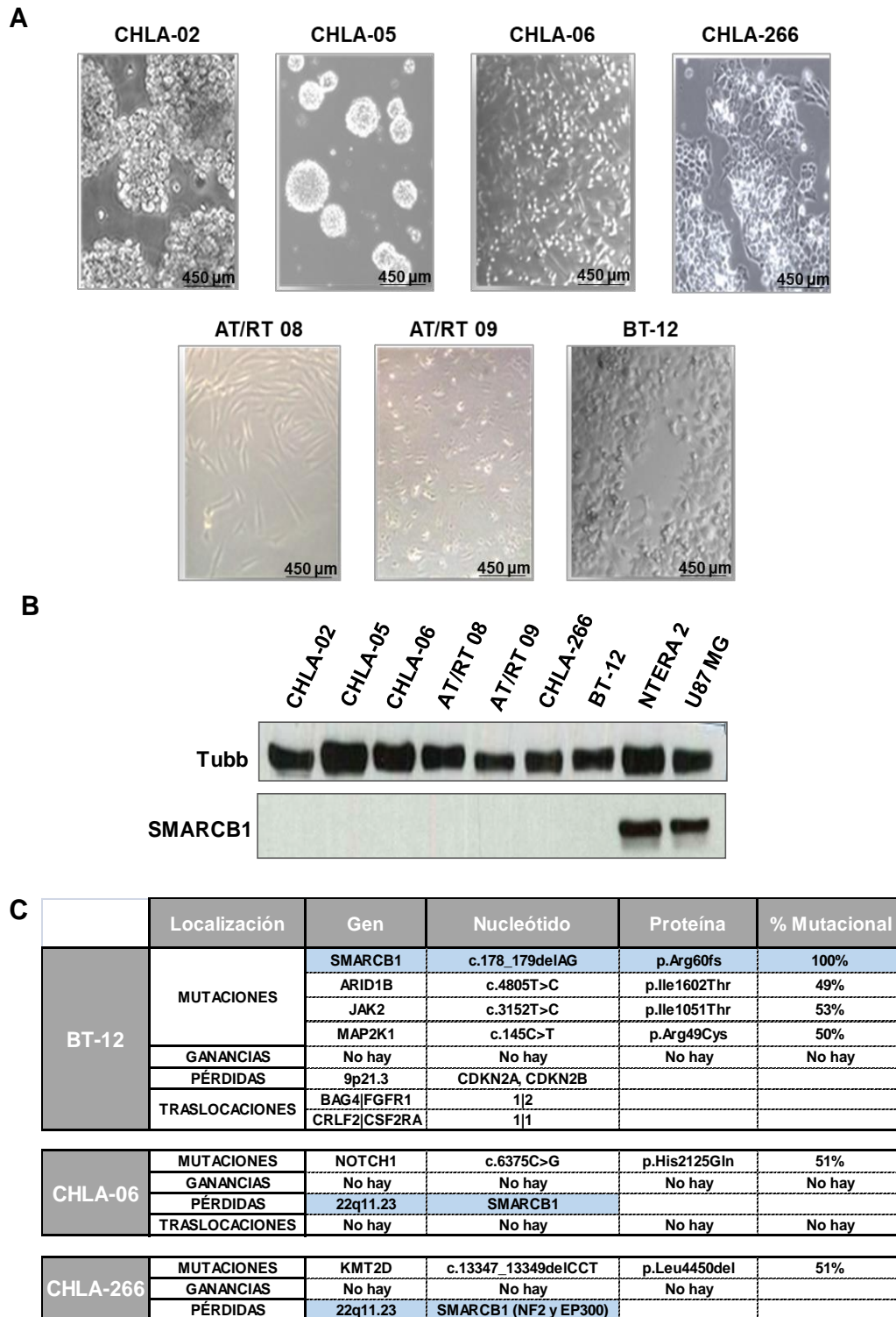


Figura 1. Caracterización y selección de los modelos AT/RT. **(A)** Imágenes de las diferentes morfologías de las líneas celulares. Fotos realizadas a 40X con un microscopio invertido. **(B)** Evaluación de la expresión de la proteína SMARCB1 en una batería de líneas de AT/RT. En todas las muestras aparece la banda control que corresponde a la tubulina (Tubb, 55 kDa) y la banda identificación de SMARCB1 (48 kDa) sólo aparece en las proteínas extraídas de las líneas control. **(C)** Caracterización molecular de las tres líneas de AT/RT mediante paneles de NGS

2. LAS LÍNEAS ESTABLES DE AT/RT SON SUSCEPTIBLES A LA INFECCIÓN POR EL ADENOVIRUS DELTA-24-RGD

2.1 Análisis de la expresión de receptores virales en AT/RT

La infectividad del Delta-24-RGD está mediada por integrinas $\alpha_v\beta_{3/5}$ y por el receptor de Coxsackie y adenovirus (CAR)¹²⁶⁸⁷. Por ello, realizamos un estudio *in silico* (Illumina HT12 v4 gene expression array data) de la expresión relativa de las integrinas α_v (ITGAV), β_3 (ITGB3), β_5 (ITGB5) y CAR (CXADR) en muestras de AT/RTs para averiguar si estos tumores pueden ser infectados por el virus oncolítico, comparándolas con muestras de cerebros normales⁴⁵. Primeramente, se analizaron 49 AT/RTs de forma global respecto a 268 cerebros normales (**Figura 2.A**) y, posteriormente, se repitió este análisis dividiendo los AT/RTs en sus tres entidades moleculares: AT/RT-TYR con 16 casos, AT/RT-SHH con otros 16 casos y AT/RT-MYC con 17 (**Figura 2.B**).

Las integrinas α_v y CAR son los que presentan niveles más altos de expresión, superando incluso los niveles observados en tejido sano. En el caso de la integrina β_5 , también se detecta su expresión, aunque con niveles similares a los de cerebro normal. Finalmente, la expresión de integrina β_3 es substancialmente menor que la que presentan las muestras de cerebro normal. A partir de los resultados de este análisis *in silico* parece que los AT/RTs son potencialmente susceptibles a la infección por el virus Delta-24-RGD debido a que existe una expresión relativa significativamente alta de varios de sus receptores.

Para validar en nuestros modelos estos resultados de expresión de receptores adenovirales, realizamos una cuantificación mediante citometría de flujo de los receptores CAR, integrina $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$, utilizando como control negativo el marcaje de las células con Anti-IgG1-PE-Vio770 (control de isotipo) (**Figura 2.C**).

Prácticamente todas las células de las líneas BT-12 y CHLA-266 expresan el receptor CAR (98,7% y 99,2% respectivamente) mientras que en la línea CHLA-06 aparece en el 60,6% de las células. La expresión de la integrina $\alpha_v\beta_5$ también aparece en porcentajes muy altos, mientras que la expresión de la integrina $\alpha_v\beta_3$ está prácticamente ausente, corroborando los datos *in silico* obtenidos anteriormente. Con estos resultados consideramos que las tres líneas son susceptibles de ser infectadas por el adenovirus.

2.2 Evaluación de la infectividad de las líneas de AT/RT por el virus Delta-24-RGD

El siguiente paso tras verificar la presencia de los receptores adenovirales, fue comprobar que éstos permiten la endocitosis del adenovirus en la célula diana. Para ello, las líneas celulares de AT/RT fueron infectadas a distintas MOIs (0,1, 1, 10 y 100 PFU/célula) con un adenovirus Delta-24-RGD portador del gen reportero *Green Fluorescent Protein* (GFP).

Tras el análisis de los resultados obtenidos de la citometría, observamos que más del 80% de las células de las tres líneas celulares estaban infectadas tras incubarlas con el virus a dosis de 1 PFU/célula del AdGFP-Delta-24-RGD. Incluso, las líneas BT-12 y CHLA-06 con una infección de menos de 0,1 PFU/célula aparecen infectadas más del 50% de las células. Así pues, concluimos que las tres líneas de AT/RT estudiadas son muy sensibles a la infección por el virus Delta-24-RGD (**Figura 2.D/E**).

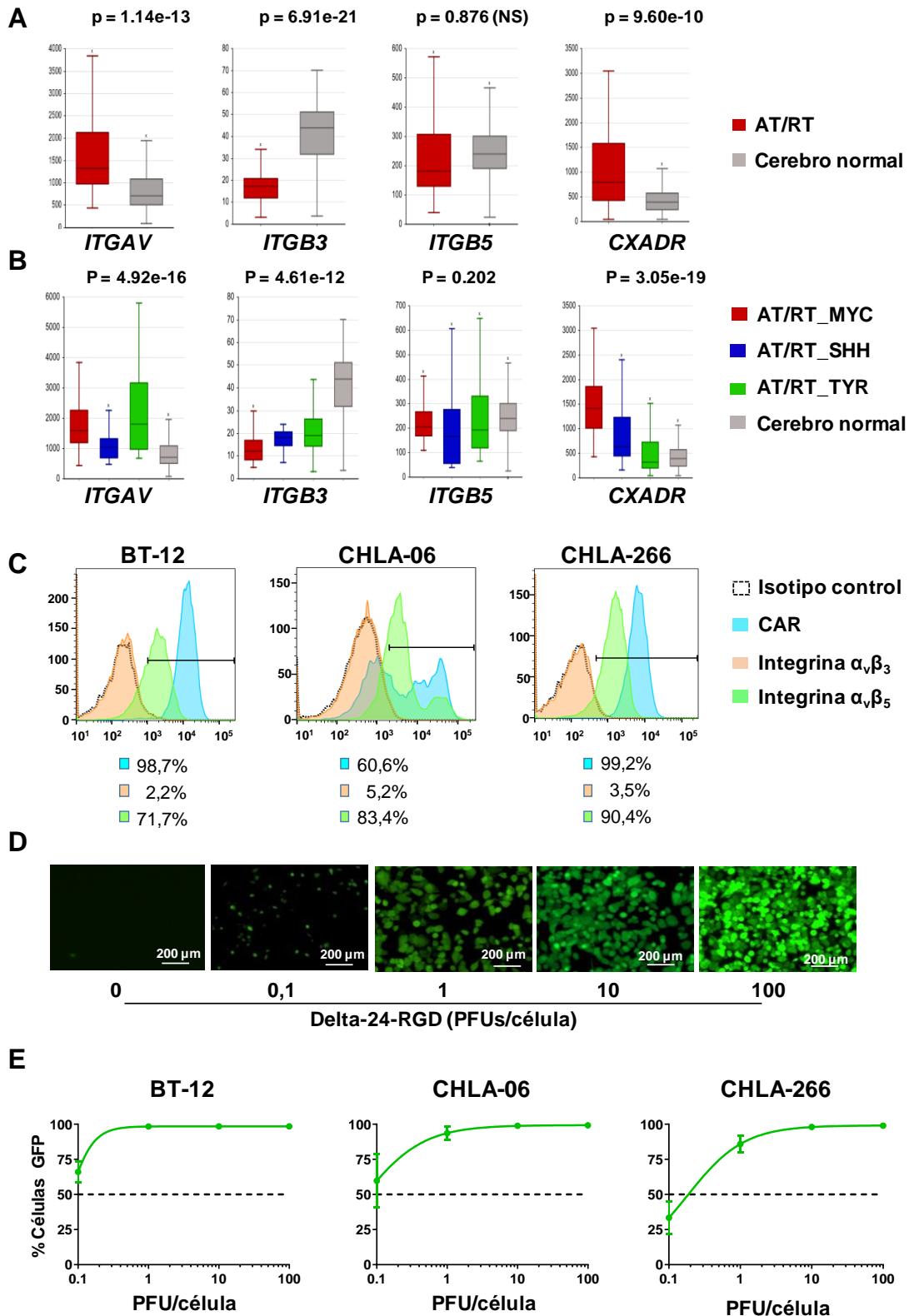


Figura 2. Análisis de la expresión de los receptores virales y evaluación de la infectividad. (A) Representación por “box-plots” de la expresión de mRNA de los receptores integrina α_v (*ITGAV*), integrina β_3 (*ITGB3*), integrina β_5 (*ITGB5*) y CAR (*CXADR*) comparando muestras de AT/RT con muestras de cerebro normal. (B) Representación por “box-plots” de la expresión de mRNA de los receptores en muestras de AT/RT clasificadas por subgrupos epigenéticos. (C) Histogramas de expresión de los receptores CAR, integrina $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ en cultivos de AT/RT mediante citometría

de flujo. La línea negra representa el umbral a partir del cual consideramos las células como positivas para la expresión del receptor. **(D)** Imágenes de microscopía de fluorescencia de la línea celular BT-12 (40X). **(E)** Representación de los porcentajes obtenidos tras el análisis por citometría de flujo 48 horas post- infección con diferentes MOIs del virus Delta-24-RGD.

3. DELTA-24-RGD SE REPLICA Y EJERCE UN EFECTO ANTITUMORAL EN LÍNEAS DE AT/RT *IN VITRO*

3.1 Replicación del virus Delta-24-RGD en las líneas de AT/RT

Como hemos explicado en la introducción, para que el Delta-24-RGD sea capaz de replicarse en las células tumorales requiere que la vía del factor de transcripción E2F se encuentre activa.

Durante la transición de la fase G1 a la fase S, los complejos CDK4/6-ciclina D1 y CDK2-Ciclina E controlan la actividad de la proteína supresora de tumores pRb, la cual en condiciones normales se encuentra asociada con E2F, impidiendo la progresión del ciclo celular. En la gran mayoría de los cánceres en humanos, la actividad de E2F se encuentra desregulada por diferentes mecanismos¹²⁷. Esta desregulación puede ser debida, entre otros mecanismos, a una pérdida funcional de la proteína Rb, un aumento en la expresión de la ciclina D1 (inhibidor de pRb), o por la pérdida de función de p16 (CDKN2) (inhibidor de CDK4/6). Como consecuencia de estos mecanismos, el Rb se fosforila liberando a E2F y produciéndose la transcripción de genes requeridos en el ciclo celular (**Figura 3.A**). Por ello, a partir de datos obtenidos por RNAseq tanto en muestras de AT/RTs, agrupados de manera global o divididos por subgrupos moleculares, como en muestras de cerebros sanos, analizamos, *in silico*, la expresión relativa de estos reguladores del ciclo celular de la vía pRb/E2F para determinar la permisividad de estos tumores a la replicación del adenovirus.

Observamos que existe una elevada expresión de los genes *CDK4*, *CDK6*, *CCND1* (ciclina D1) y *RBI*, lo que conlleva a una desregulación del ciclo celular¹²⁸(**Figura 3.B**). Si nos centramos en el análisis realizado por subgrupos, y teniendo en cuenta que las tres líneas celulares con las que trabajamos son del subgrupo MYC, destaca la alta expresión de *CCND1* (**Figura 3.C**). Esta sobreexpresión de los reguladores de ciclo celular de la vía pRb/E2F nos indican que, posiblemente, existirá un aumento en la liberación de E2F-1 que permitiría la replicación del virus. Efectivamente, los datos *in silico* nos informaban de que los niveles de expresión relativa de *E2F1* eran más altos

en las muestras de AT/RT respecto a muestras de cerebros normales (fetales y adultos) (**Figura 3.D**). Para comprobar si nuestras líneas iban a ser permisivas a la replicación de adenovirus aun en ausencia de mutaciones en la vía pRB-E2F1, realizamos un estudio de la actividad del promotor del E2F-1 en las líneas de AT/RT sin mutaciones en esta vía (CHLA-06 y CHLA-266) comparándola con astrocitos humanos normales (NHA). Los niveles de actividad del promotor E2F-1 en las líneas CHLA-06 y CHLA-266 son significativamente más elevados que en los astrocitos normales, llegando a presentar una actividad 16 veces más alta (**Figura 3.E**). Estos resultados demuestran que, a pesar de que la vía del pRb-E2F no se encuentra directamente afectada a nivel genómico, existen otros mecanismos, posiblemente epigenéticos, que aumentan la actividad de E2F-1³¹. Todos estos datos nos indican que estos tumores pueden ser permisibles para la replicación del Delta-24-RGD.

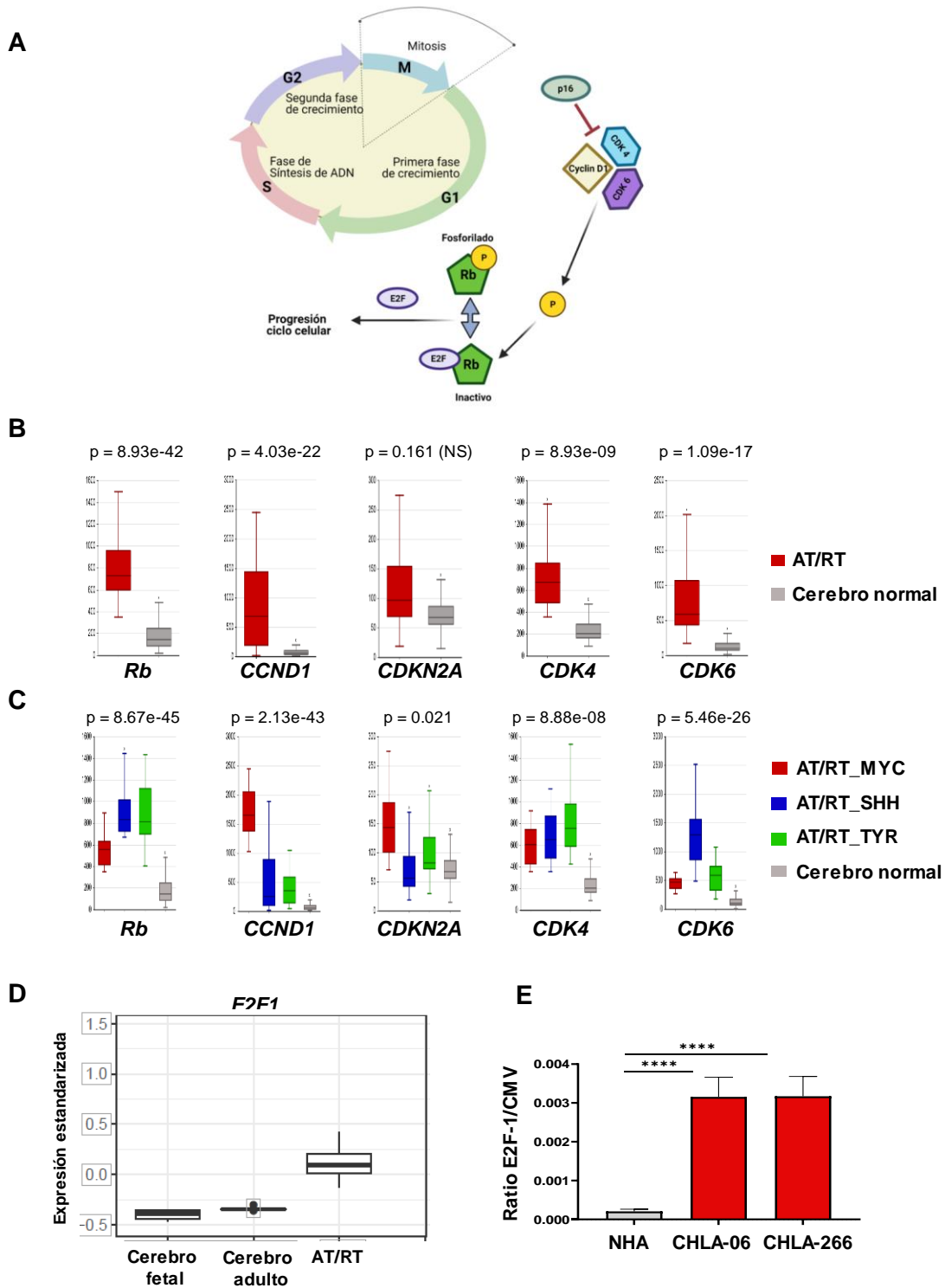


Figura 3. (A) Esquema de la vía Rb/E2F1 en el ciclo celular. Imagen adaptada de Erik S. Knudsen¹²⁹. (B y C) Representación por “box-plots” de la expresión de mRNA de *RBI*, *CCND1*, *CDKN2*, *CDK4* y *CDK6* en muestras de AT/RTs comparándolo con muestras de cerebro normal, analizando todos los AT/RTs en conjunto (B) o divididos por subgrupos moleculares (C). (D) Representación por “box-plot” de los niveles de expresión de *E2F1* en cerebros normales (fetales y adulto) y AT/RT. (E) Medición de la actividad del factor de transcripción E2F-1 tanto en astrocitos normales humanos (NHA) como en las líneas de AT/RT CHLA-06 y CHLA-266. Los valores se han representado como la ratio de la señal de los reporteros E2F-1/CMV (media ± desviación estándar (D.E.); n=3; ANOVA de una vía; $p < 0.0001$).

Para confirmar la replicación del adenovirus sobre las líneas celulares analizamos la expresión por Western blot de dos proteínas virales cruciales para el ciclo viral: 1) la proteína E1A, unidad del genoma de expresión temprana del adenovirus y principal regulador de la transcripción viral, y 2) fibra, proteína estructural necesaria para la formación de la cápside del virus, es decir, nos informa de la formación de nuevos viriones (existencia de replicación viral). Como control de carga de las muestras utilizamos la expresión de Grb-2 y como control negativo extracto celular no infectado. Las tres líneas fueron infectadas con dosis crecientes de Delta-24-RGD y recogidas a 16 y 48 horas post-infección.

La proteína E1A debido a su temprana expresión, aparece en todas las líneas a las 16 horas. En cambio, la fibra, tal y como esperábamos, aparece sólo a 48 horas ya que es una proteína tardía. (**Figura 4A**). Debido a que la expresión de la fibra va condicionada a la replicación del genoma viral⁹⁵ este resultado nos sugiere que la actividad E2F en estas líneas permite que el adenovirus progrese en su ciclo viral replicativo.

El resultado anterior nos indica la transición de fase temprana a fase tardía. Después, el virus ha de ensamblar y madurar las cápsides para formar partículas infecciosas funcionales. Para determinar si el virus es capaz de generar una progenie viral infecciosa en las líneas de AT/RT realizamos una titulación viral en cultivos infectados (tanto células como sobrenadante) con Delta-24-RGD (MOI de 10) a las 16 y 72 horas después de la infección. A las 16 horas post-infección las muestras presentan de manera significativa y reproducible menos partículas virales infecciosas comparadas con las muestras recogidas a las 72 horas (**Figura 4B**). Analizando los resultados, las líneas BT-12 ($p = 0,05$) y CHLA-06 ($p = 0,0143$) mostraron unos títulos de virus de aproximadamente 5×10^8 PFUs, cuando basalmente a 16 horas era menos que el número inicial de virus ($input = 5 \times 10^5$ PFUs) lo que indica un incremento en el título viral de tres órdenes de magnitud. La línea celular CHLA 266, mostró una concentración de $4,6 \times 10^6$ PFU/mL 72 horas después de la infección, un incremento algo menor que las anteriores, pero igualmente significativo ($p = 0,05$). Estos resultados nos llevan a concluir que el adenovirus Delta-24-RGD es capaz de replicarse eficazmente en las tres líneas celulares de AT/RT.

3.2 Efecto citotóxico del virus oncolítico en cultivos de AT/RT

Una vez comprobado que las líneas BT-12, CHLA-06 y CHLA-266 son permisivas para la infección y replicación viral, evaluamos el efecto antitumoral *in vitro* del Delta-24-

RGD en estos modelos. Para ello, tratamos las líneas celulares de AT/RT con dosis crecientes del Delta-24-RGD y analizamos la viabilidad mediante MTS a los 3 y 5 días post-infección.

Como podemos observar en las gráficas (**Figura 4.C**), en todas las líneas celulares existe un efecto citolítico dosis-dependiente a los 3 días post-infección, variando el IC_{50} desde 10,9 a 20,1 PFU/célula dependiendo de la línea celular. Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos con la generación de partículas virales infecciosas cuantificadas a las 72 horas después de la infección (existe menos replicación en la línea CHLA-266 donde el IC_{50} a 3 días es el más elevado), confirmando la formación de adenovirus funcionales. Los resultados tras 5 días post-infección nos revelan que, la dosis inicial requerida para alcanzar una muerte del 50% en el cultivo celular se redujo drásticamente en todas las líneas, siendo necesario menos de 1,0 PFU por célula. Esto es debido al aumento de los ciclos de infección/replicación/citolisis.

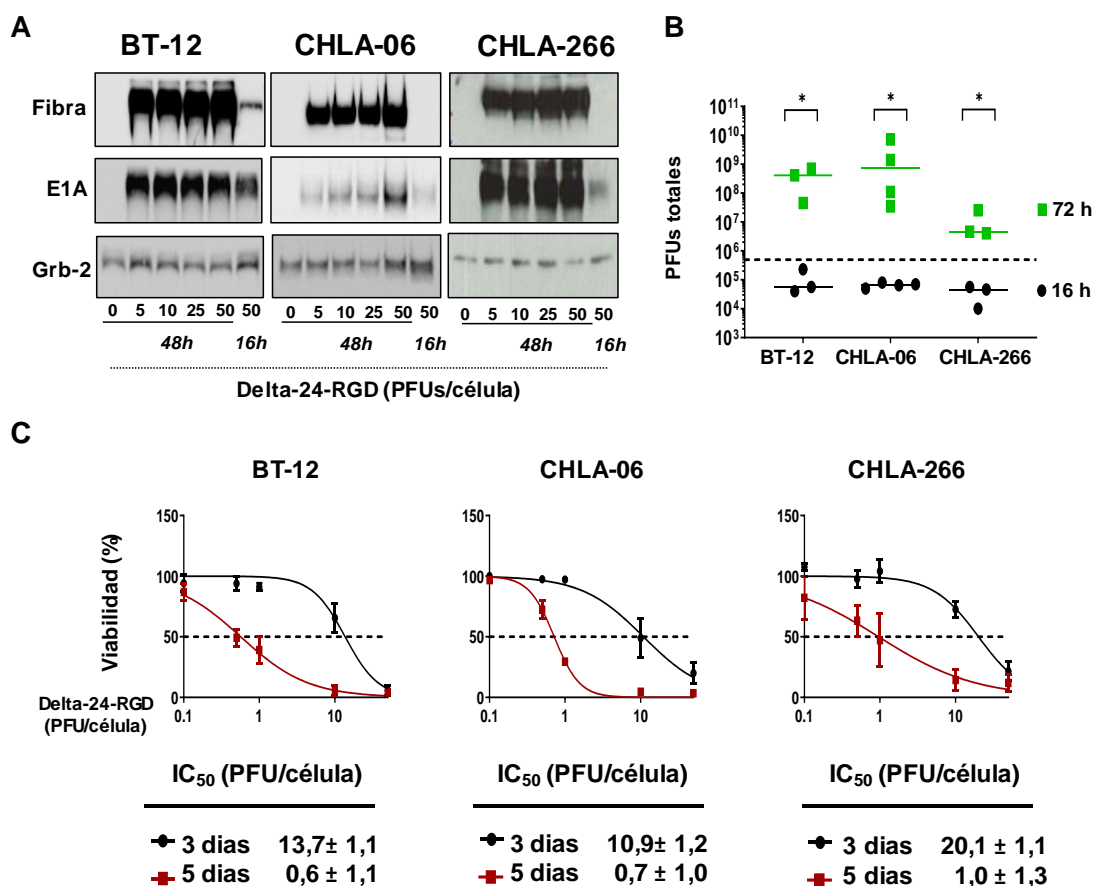


Figura 4. Delta-24-RGD se replica y ejerce un efecto antitumoral en las tres líneas de AT/RT. (A) Detección de las proteínas Fibra, E1A y Grb-2 por Western blot a 16 y 72 horas. Los tamaños son de 62, 45 y 25 kDa respectivamente. (B) Cuantificación de los títulos virales (PFUs totales) en 1 mL de lisado de cultivos de BT-12, CHLA-06 y CHLA-266 16 horas (negro) and 72 horas (verde) después de la infección con Delta-24-RGD a una MOI de 10. La línea de puntos indica el número total inicial de virus (*input*) (5×10^5 PFUs). Los puntos especifican los títulos virales para cada réplica experimental y las barras representan la mediana del título viral \pm 95% intervalo de confianza (I.C.) (n=3/4; test de Mann-Whitney de una cola). (C) Se realizaron ensayos MTS para determinar los porcentajes de células viables BT-12, CHLA-06 y CHLA-266 a los tres (en negro) y cinco (en rojo) días después de la infección con 0'1, 0'5, 1, 10 y 50 PFUs/célula de Delta-24-RGD. Los valores indican porcentajes de células viables en comparación con los de cultivos no infectados (media \pm D.E., n = 3).

3.3 Las células infectadas inducen la secreción de patrones moleculares asociados a daño

El adenovirus Delta-24-RGD, además de desarrollar una actividad citolítica, es capaz de estimular una respuesta inmunitaria antitumoral^{76,79} ya que promueve un entorno proinflamatorio en el tumor. Uno de los mecanismos que participan en la mejora de la respuesta inmune es la muerte celular inmunogénica (MCI), una muerte programada que incluye la secreción al medio extracelular de moléculas que dan una señal de peligro al sistema inmunológico. Son los llamados Patrones Moleculares Asociados a Daño (DAMPs) y están representadas por varias moléculas. Entre ellas se encuentran la calreticulina (Ecto-CRT), expuesta en la superficie y supone una de las señales más tempranas e importantes, la secreción de ATP y la liberación basal de proteínas de choque térmico (Hsp90 α) y de la proteína *High Mobility Group Box 1* (HMGB1)¹³⁰.

Para verificar si la infección del adenovirus en células de AT/RT es capaz de generar este tipo de señales, recogimos los sobrenadantes de las tres líneas celulares, 72 horas después de la infección con la dosis correspondiente a la IC₅₀ de los tres días de cada modelo. Realizamos la técnica de ELISA para cuantificar las proteínas, Hsp90 α y HMGB1 y además se midió la concentración de ATP en los sobrenadantes de las células AT/RT infectadas y en las células control (*mock*, nivel basal).

En las tres líneas celulares observamos un aumento significativo de los niveles de Hsp90 α y HMGB1 en los sobrenadantes de los cultivos infectados con Delta-24-RGD comparándolos con los no infectados. La concentración de ATP también mostró una tendencia a aumentar, aunque no fue estadísticamente significativa (**Figura 5.A**).

La translocación a la superficie celular de la proteína calreticulina (CRT) residente en el

retículo endoplásmico es otro mecanismo bien conocido que contribuye a la inmunogenicidad del tumor al actuar como una señal de "cómeme" para promover la fagocitosis de las células tumorales por parte de los macrófagos¹³¹. La infección temprana por Delta-24-RGD desencadenó la reubicación de la CRT a la membrana (Figura 5.B). En conjunto, llegamos a la conclusión de que Delta-24-RGD no solo induce un efecto antitumoral *in vitro*, sino que también promueve la liberación de DAMPs que podrían eventualmente activar los mecanismos MCI *in vivo*.

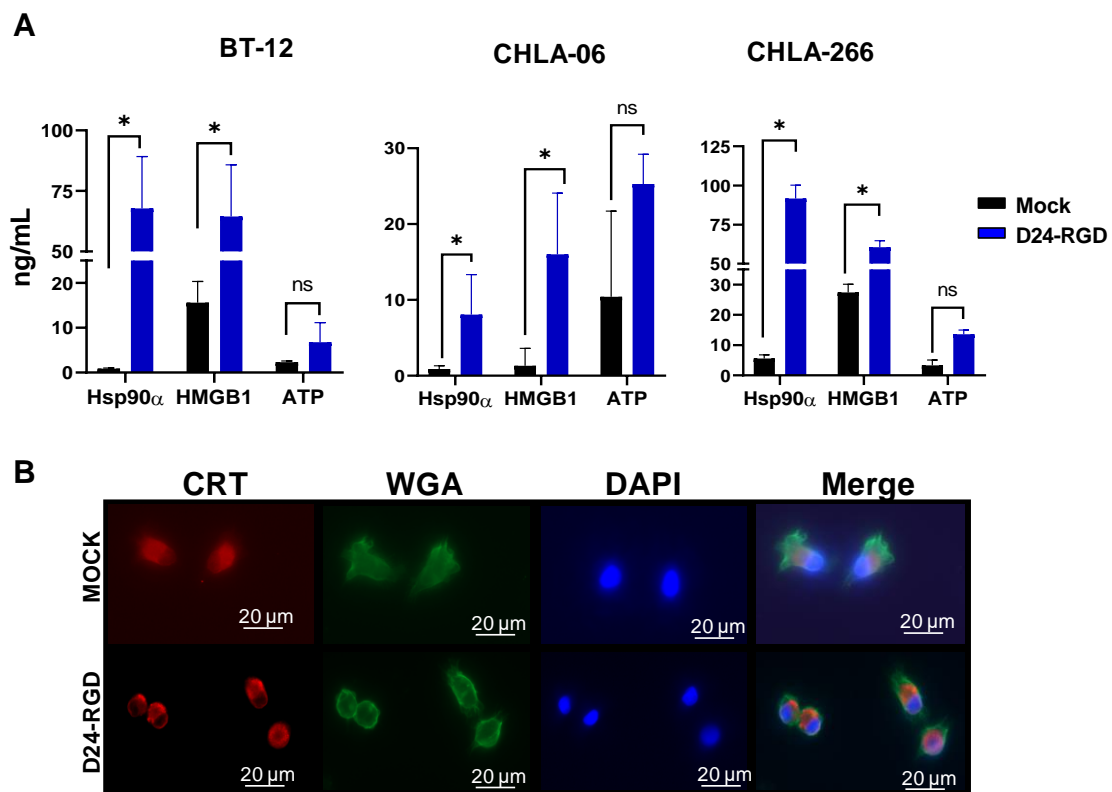


Figura 5. Las células infectadas inducen la secreción de Patrones Moleculares Asociados a Daño. (A) Concentraciones de los patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) —Hsp90α, HMGB1 y ATP— en sobrenadantes obtenidos de cultivos de BT-12, CHLA-06 y CHLA-266 a las 72 horas de la infección con Delta-24-RGD a los valores IC₅₀ correspondientes para cada grupo o después de una infección simulada. Los gráficos de barras indican la media ± D.E. (n = 3; test de Mann-Whitney) (* ≤ 0,05). (B) Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia del cultivo de CHLA-06 4 horas post-infección con Delta-24-RGD vs una infección simulada (*mock*). La calreticulina (CRT) se detectó por inmunofluorescencia (rojo) en las superficies celulares, las membranas celulares (verde) y los núcleos (azul) se tiñeron con aglutinina de germen de trigo (WGA) y DAPI, respectivamente.

4. EVALUACIÓN Y PUESTA A PUNTO DE LA CINÉTICA TUMORAL EN LOS MODELOS SUPRA E INFRATENTORIAL EN RATÓN

Los tumores de AT/RT se han descrito en diferentes localizaciones del SNC, siendo la mayoría en la parte supratentorial e infratentorial¹⁶. El desarrollo de estos modelos ortotópicos en ratón comúnmente se habían realizado por medio de estereotaxia, con lo cual, nuestro primer paso fue poner a punto la técnica mediante el sistema *guide-screw*¹²⁴ con las líneas de AT/RT en ambas localizaciones.

Tanto para el modelo supratentorial como para el infratentorial, implantamos diferentes números de células de cada una de las líneas celulares para realizar un estudio de cinética tumoral y decidir cuál sería el número de células óptimo para realizar nuestros experimentos de supervivencia. Tras el análisis de los resultados, la línea BT-12 quedó descartada para el modelo supratentorial, debido a la numerosa aparición de tumores extracraneales. Finalmente, decidimos implantar para el modelo supratentorial 2×10^6 de células de la línea CHLA-266 y 0.5×10^6 células de las tres líneas celulares, en la localización infratentorial ya que, con ese número de células, los tiempos de supervivencia eran adecuados para el estudio de los diferentes tratamientos.

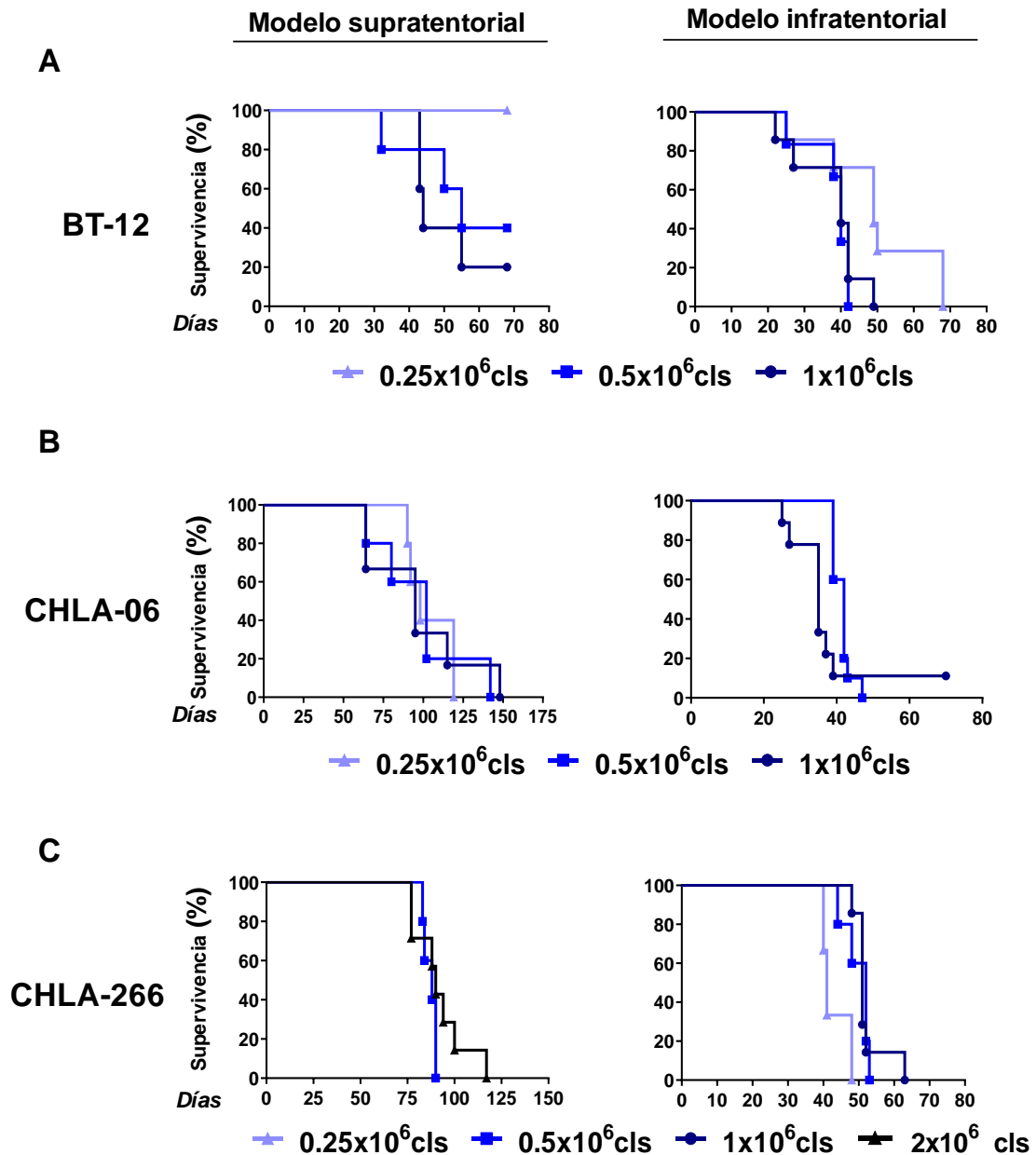


Figura 6. Gráficas de supervivencia (prueba de rango logarítmico) en el modelo supratentorial (panel izquierdo) e infratentorial. (panel derecho) para evaluar la cinética de las líneas celulares (A) BT-12, (B) CHLA-06 y (C) CHLA-266.

5. DELTA-24-RGD INCREMENTA SIGNIFICATIVAMENTE LA SUPERVIVENCIA EN MODELOS PRECLÍNICOS MURINOS DE AT/RT LOCALIZADO

Una vez establecidas las condiciones óptimas para desarrollar los tumores in vivo, analizamos el efecto terapéutico del Delta-24-RGD en estos modelos. Para ello, tanto para la localización infratentorial como supratentorial, seguimos el mismo patrón: tres

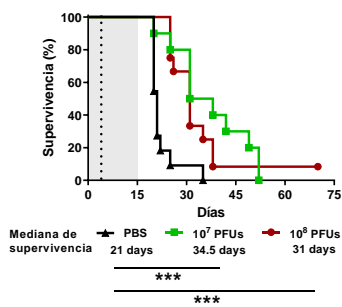
días antes de la implantación de las células se realiza una intervención donde colocamos el tornillo guía, según las coordenadas correspondientes a su localización y se inyectan las células, y cuatro días después tratamos a los ratones con el adenovirus. Para el modelo infratentorial, implantamos 5×10^5 células de BT-12, CHLA-06 y CHLA-266 en el cerebelo de los ratones y los tratamos con una única inyección de Delta-24-RGD administrada intratumoralmente a dos dosis diferentes (10^7 y 10^8 PFU/ratón) o con solución salina (PBS). En el caso del grupo control del experimento con CHLA-06, los ratones desarrollaron rápidamente síntomas típicos de presencia de tumor, con una mediana de supervivencia de 21 días (**Figura 7.A**). Los animales tratados con el adenovirus incrementaron la supervivencia de manera significativa, con una mediana de 31 días en el grupo de la dosis más alta (10^8 PFU/ratón, $p = 0,0004$) y 34,5 días para la dosis baja (10^7 PFU/ratón, $p = 0,0005$) y, además, un ratón fue superviviente de largo tiempo en el grupo de 10^8 PFU. En el experimento con la línea BT-12, también el tratamiento con el virus aumentó la supervivencia en los animales que habían sido tratados con el virus, siendo de 45 días en el grupo control, y 55 y 85,5 días en los grupos 10^7 ($p = 0,19$) y 10^8 PFU/ratón ($p = 0,0027$), respectivamente, y con un ratón superviviente de largo tiempo sin síntomas de enfermedad en el grupo tratado con 10^8 PFU (**Figura 7.B**). En el caso de los ratones tratados con el virus tras la implantación de las células de la línea CHLA-266, las medianas de supervivencia aumentaron de manera significativa, pasando a ser de 64,5 en el grupo control a 81 y 110 días 10^7 y 10^8 PFU/ratón respectivamente ($p = 0,0995$, $p = 0,0013$). Con esta última línea obtuvimos dos ratones supervivientes de largo tiempo de los 11 ratones tratados con la dosis más alta de Delta-24-RGD (**Figura 7.C**).

Tras el sacrificio de los animales, comprobamos por inmunohistoquímica la presencia de las proteínas E1A y hexón, confirmando la infección y replicación del virus Delta-24-RGD en la masa tumoral. Cabe destacar que la presencia de estas proteínas virales era detectada incluso a los 100 días post-tratamiento (**Figura 7 B y C-panel derecho**), indicando la persistencia del virus y por tanto su replicación incluso a tiempos largos. En ratones supervivientes de largo tiempo sin tumor no se encontró virus, en congruencia con la especificidad del virus para replicarse en las células tumorales.

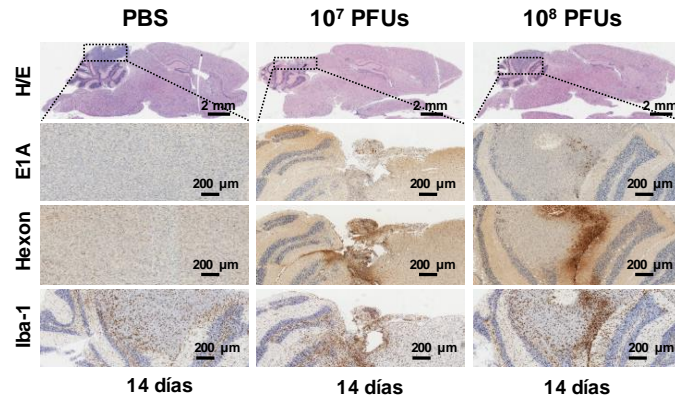
En el caso de los tumores CHLA-06, los ratones de los grupos tratados con adenovirus presentaban una acumulación de microglía alrededor del tumor (marcador Iba-1) e infiltración de microglía reactiva con fenotipo ameboido. Estas zonas de infiltración

coinciden con las áreas infectadas por Delta-24-RGD, lo que indica, que el virus indujo cambios sustanciales en el microambiente inmunológico del tumor (**Figura 7 A-panel derecho**). Los animales, como se indica en la parte inferior de las imágenes de IHC, fueron todos sacrificados 14 días después del tratamiento, para valorar los posibles cambios en el mismo marco temporal.

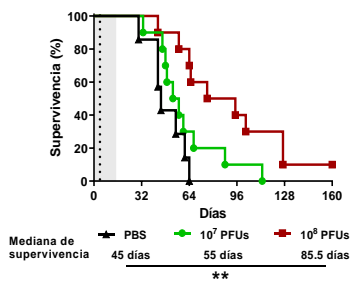
A



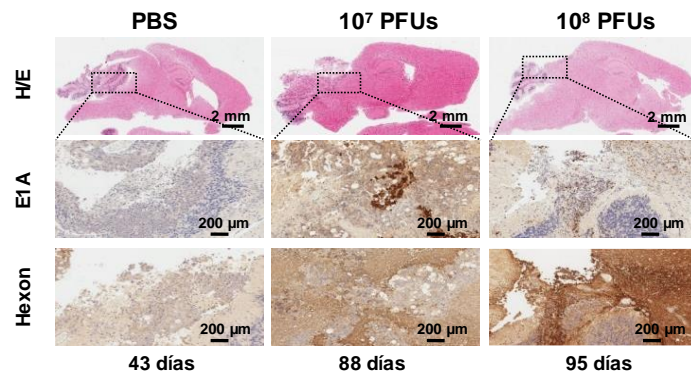
CHLA-06



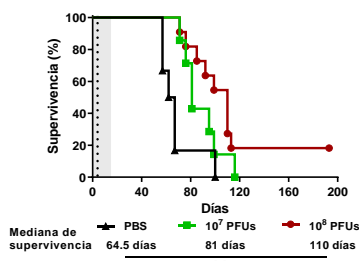
B



BT-12



C



CHLA-266

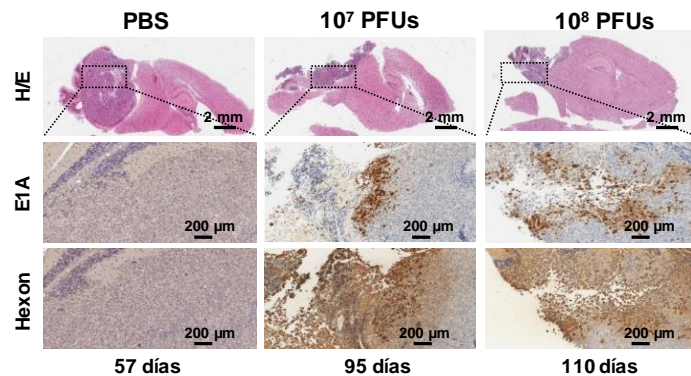


Figura 7. Delta -24-RGD incrementa la supervivencia en modelos preclínicos murinos de AT/RT localizado en fosa posterior. Comparaciones de las curvas de supervivencia (prueba de rango logarítmico) entre los ratones con tumores infratentoriales (cerebelo) de las líneas BT-12 (A), CHLA-06 (B) y CHLA-266 (C) y posterior tratamiento con PBS (*mock*) o con 10^7 o 10^8 PFUs de Delta-24-RGD. La tabla debajo de cada gráfico de supervivencia contiene la mediana de supervivencia y la significación estadística de las comparaciones entre el grupo tratado con 10^7 o 10^8 PFUs y el grupo *mock*. A la derecha de cada gráfico están las imágenes representativas de los tumores teñidos con H/E e inmunotinción para las proteínas adenovirales E1A y hexón. En el caso de la CLHA-06 también se realizó el marcador microglial Iba-1. En la parte inferior de cada imagen se detalla el día de sacrificio del ratón. Las líneas verticales discontinuas en los gráficos de supervivencia indican el día de la administración de Delta-24-RGD.

Debido a que los AT/RT también pueden surgir en ubicaciones supratentoriales, las células CHLA-266 se inyectaron ortotópicamente en el núcleo estriado (**Figura 8**). En este modelo, observamos un aumento significativo en la mediana de la supervivencia de los ratones tratados con Delta-24-RGD (132 días, $p = 0,01$) respecto al grupo control. Además, el 29% de estos ratones (2/7) fueron supervivientes de largo tiempo sin presentar tumor en las tinciones de H/E (**Figura 8**). Estos datos subrayan el beneficio terapéutico de Delta-24-RGD en modelos preclínicos de ratón de AT/RT localizado.

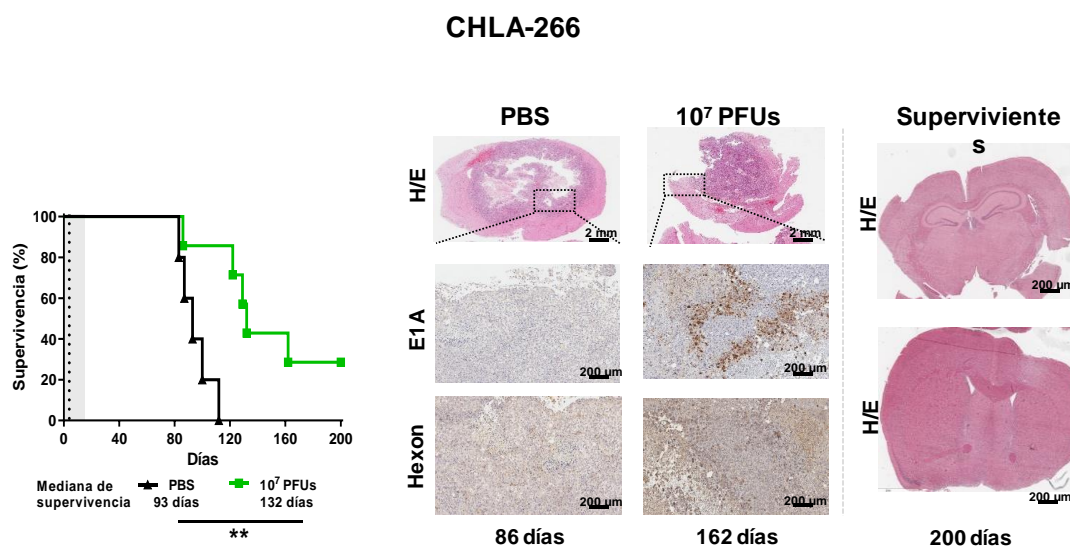


Figura 8. Delta-24-RGD incrementa la supervivencia en un modelo preclínico murino de AT/RT localizado en núcleo estriado. Comparaciones de las curvas de supervivencia (prueba de rango logarítmico) entre los ratones con tumores supratentoriales CHLA-266 que fueron tratados con PBS o con 10^7 PFUs de Delta-24-RGD. La tabla debajo del gráfico de supervivencia contiene la mediana de supervivencia y la significación de la comparación entre el grupo tratado con 10^7 PFUs y el grupo tratado con PBS. Las líneas verticales discontinuas en los gráficos de supervivencia indican el día de la administración de Delta-24-RGD. A la derecha del gráfico están las imágenes representativas de los tumores teñidos con H/E e inmunotinción para las proteínas adenovirales E1A y hexón. Además se presentan las H/E de los dos ratones supervivientes.

6. EL VIRUS DELTA-24-RGD INCREMENTA LA SUPERVIVENCIA DE RATONES CON TUMOR AVANZADO

Dentro del contexto clínico en el momento que se diagnostican estos tumores ya están avanzados por ello decidimos evaluar también el efecto terapéutico del virus en tumores establecidos. Para poder decidir el día de administración del virus, primero establecimos el marco temporal en los que los ratones con células CHLA-266 en el modelo supratentorial y células CHLA-06 en el modelo infratentorial mostraban tumores visibles. En el caso de la CHLA-266 se comprobó que 29 días más tarde de la implantación de las células ya se podían observar masas tumorales evidentes, y en el caso de CHLA-06 esto se observó a los 8 días post-implantación (**Figura 9 A.1/B.1**). En base a los datos anteriores, comenzamos el tratamiento con Delta-24-RGD a los 29 y 8 días tras la implantación de los tumores CHLA-266 y CHLA-06, respectivamente. Tras la administración de los tratamientos PBS, 10^7 y 10^8 PFU/ratón en los días establecidos para cada línea celular, se destaca que, en el caso del modelo supratentorial, se obtuvo un aumento significativo de la supervivencia con ambas dosis de Delta-24-RGD (10^7 PFU/ratón, $p = 0,0003$; 10^8 PFU/ratón $p < 0,0001$), incluso un ratón fue superviviente de largo tiempo (**Figura 9 A.2**). En el caso de la línea celular CHLA-06 el tratamiento con la dosis más alta (10^8 PFU/ratón) de Delta-24-RGD supuso un aumento en la supervivencia sin llegar a ser estadísticamente significativo ($p = 0,07$) a pesar de conseguir también un largo superviviente (**Figura 9 B.2**)

Los análisis anatomopatológicos mostraron la capacidad del virus de propagarse en el tumor (**Figura 9 A.3/B.3**). Además, estos análisis revelaron una infección y replicación persistentes en la masa tumoral (tinción de E1A y hexón, respectivamente), así como un alto grado de infiltración de microglía reactiva. Es de interés remarcar que observamos un enriquecimiento de microglía reactiva en los focos de replicación viral. Estos datos sugieren que el tratamiento del virus provoca una activación de la microglía, lo que podría estimular la respuesta innata contra el tumor. Los estudios anatomopatológicos con la línea CHLA-266 se realizaron 15 días después del tratamiento.

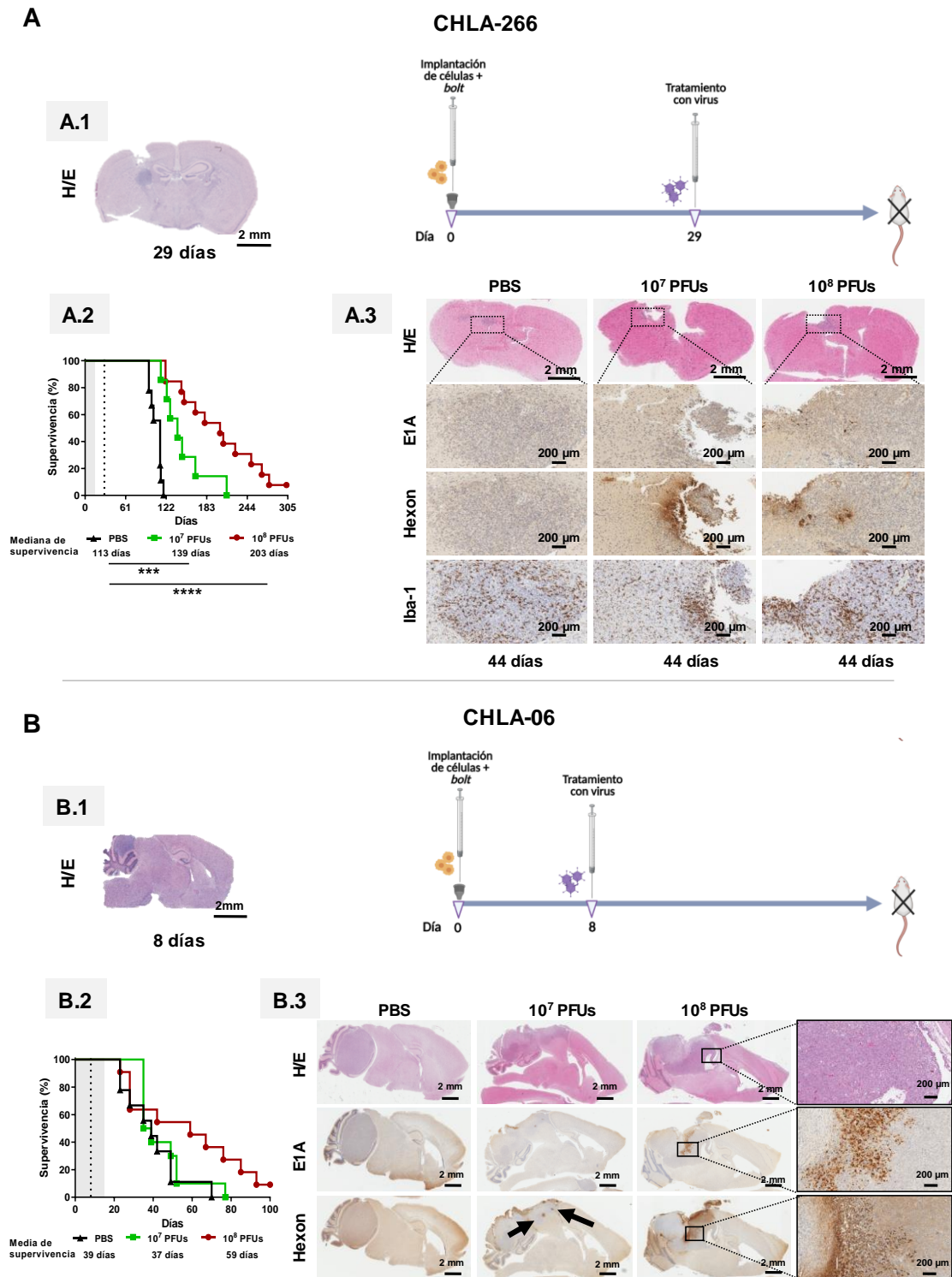


Figura 9. Delta-24-RGD aumenta la supervivencia en ratones con tumor establecido. Representación de los dos modelos de tumor establecido, (A) supratentorial con CHLA-266 y (B) infratentorial con CHLA-06. (A.1/B.1) H/E a día 29 (A.1) y 8 (B.1) después del implante del tumor. (A.2/B.2) Gráfico de supervivencia con la mediana de supervivencia en la parte inferior. La línea vertical discontinua en el gráfico de supervivencia indica la administración de Delta-24-RGD. (A.3/B.3) Análisis histológico de los tumores; H/E, las proteínas virales E1A y hexón y, en el caso de la línea CHLA-266, el marcador de microglía Iba-1.

7. EL VIRUS DELTA-24-RGD ES CAPAZ DE IMPEDIR EL DESARROLLO DE LESIONES DISEMINADAS EN MODELOS PRECLÍNICOS MURINOS

7.1 Puesta a punto del modelo diseminado

Debido a la que la mayoría de los pacientes presentan enfermedad diseminada en la médula espinal en el momento del diagnóstico¹⁸, decidimos generar un modelo murino donde pudiéramos evaluar la eficacia del tratamiento con Delta-24-RGD para este tipo de casos.

Desarrollamos la línea estable BT-12-GFP/luciferasa generada por transducción de la línea de AT/RT BT-12 con un lentivirus MSCV-Luc-IRES-GFP. Para la verificación y cuantificación de células con expresión GFP, las muestras se analizaron por citometría. Como el porcentaje de expresión de GFP tras la infección de las células estaba por debajo del 90% (83,8%), decidimos enriquecer el cultivo en células transducidas mediante *cell sorting* y, tras la amplificación, conseguimos establecer una línea de BT-12 con un 99.6 % de células con expresión de GFP (**Figura 10**).

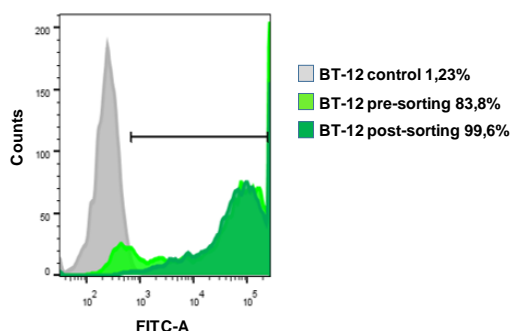


Figura 10. Histograma de expresión de GFP de la línea celular BT-12 parental, transducida con un vector lentiviral GFP/Luc antes y después del enriquecimiento por *sorting*. La línea negra representa el umbral de fluorescencia para las células GFP+.

El siguiente paso fue poner a punto el sistema *guide-screw* en las coordenadas ya definidas por Adam W. Studebaker para el modelo diseminado en un trabajo previo donde utilizaban la estereotaxia para el desarrollo del mismo¹³². Una vez colocado el tornillo en la localización adecuada, introducimos tinta china por medio de una jeringa Hamilton a una profundidad de 4,7 mm (incluyendo la medida de profundidad del *bolt*), donde se sitúa el ventrículo lateral derecho. Tras el marcaje, el ratón fue sacrificado. Una vez extraído el cerebro, realizamos un corte sagital y pudimos observar que los

ventrículos estaban teñidos por la tinta indicando que la inyección se había realizado en la localización adecuada (**Figura 11. A**).

Confirmada la viabilidad de esta técnica para el modelo diseminado, implantamos 1×10^6 células de la línea BT-12-GFP/luc en el ventrículo. Tras la cirugía y con el ratón todavía bajo anestesia, le administramos luciferina intraperitonealmente y evaluamos la cantidad de luz emitida. Con ello, comprobamos que las células estaban en el lugar adecuado y, además, obteníamos la primera imagen de seguimiento del animal. La cuantificación de la se llevó a cabo los días 7, 11 y 27 (**Figura 11 B**). Tanto luminómetricamente como histológicamente (hematoxilina/eosina y GFP) confirmamos que la línea celular BT-12 es capaz de generar lesiones diseminadas tras la inoculación de las células en el ventrículo, como podemos observar en la (**Figura 11 C**).

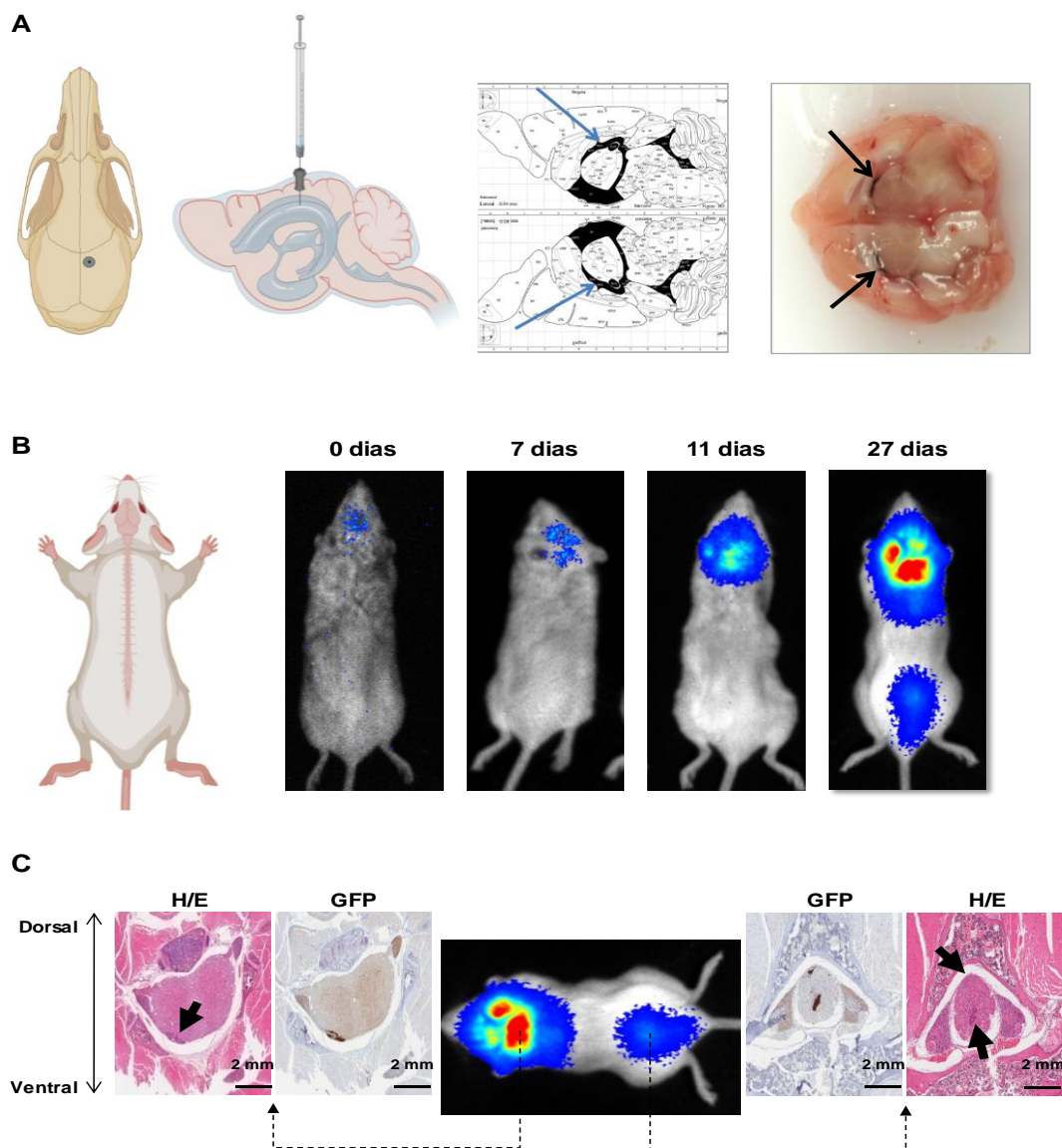


Figura 11. Puesta a punto del modelo murino de AT/RT diseminado. (A) Comprobación mediante la inyección de tinta china de las coordenadas planteadas para el modelo. (B) Imágenes representativas de bioluminiscencia a diferentes días tras la administración de células BT-12-GFP/luc, apareciendo diseminación craneal y en la médula espinal. (C) Tinciones de H/E y GFP donde se confirma la presencia de depósitos de células tumorales en ambas localizaciones. Las flechas negras indican las lesiones tumorales.

7.2 Efecto antitumoral del virus Delta-24-RGD en el modelo diseminado

Una de las principales causas del fracaso terapéutico en AT/RT es la presencia de enfermedad diseminada. Por ello, una vez puesto a punto el modelo diseminado evaluamos la eficacia del virus en este contexto.

Tras el experimento de supervivencia y, gracias al seguimiento por imágenes de bioluminiscencia, encontramos que hacia el día 26-27 el 58% de los ratones del grupo control habían desarrollado tumores secundarios y sólo un 8-10% lo habían hecho tras el tratamiento con el adenovirus Delta-24-RGD (**Figura 12.A**). Además de la disminución en la presentación lesiones tumorales secundarias, el tamaño tumoral desarrollado en los ratones tratados eran significativamente más pequeño que el desarrollado en el grupo control, tal y como lo revela la cuantificación de fotones realizada en los días 4, 15 y 22 (**Figura 12.B**). Los tamaños de los tumores fueron comparados mediante la cuantificación de la emisión de fotones (cuentas por minuto, cpm) a día 15 y 22 normalizados a día 4. A día 15 nos encontramos una disminución significativa administrando tanto 10^7 ($p = 0,0002$) como 10^8 ($p = 0,0002$) PFU/ratón. Esta significación se observó también a día 22, con una $p = 0,0002$ y $p = 0,0009$ en el grupo de 10^7 y 10^8 PFU/ratón respectivamente. Las diferencias en la evolución de los tumores se observan claramente tanto por imágenes de bioluminiscencia (**Figura 12.C**) como en el análisis de cuantificación de los fotones (cpm) (**Figura 12.D**) tomadas a diferentes días.

El tratamiento de los ratones con la dosis más alta de Delta-24-RGD (10^8 PFUs), incrementa significativamente la supervivencia comparada con el grupo control tratado con PBS ($p < 0,0001$). Incluso el 70% de los ratones son supervivientes de largo tiempo (**Figura 12.E**). A pesar de que, tras el tratamiento con la dosis de 10^7 PFUs no existen diferencias significativas en la media de supervivencia ($p = 0,13$), se observa que hay una tendencia a la mejora, ya que la supervivencia aumenta de 32,5 días en el grupo control a 54 días en el tratado con esta dosis, además de conseguir dos supervivientes de largo tiempo.

Con estos resultados, podemos concluir que el tratamiento con Delta-24-RGD en este modelo diseminado provoca un claro efecto antitumoral, dificultando la aparición de enfermedad diseminada.

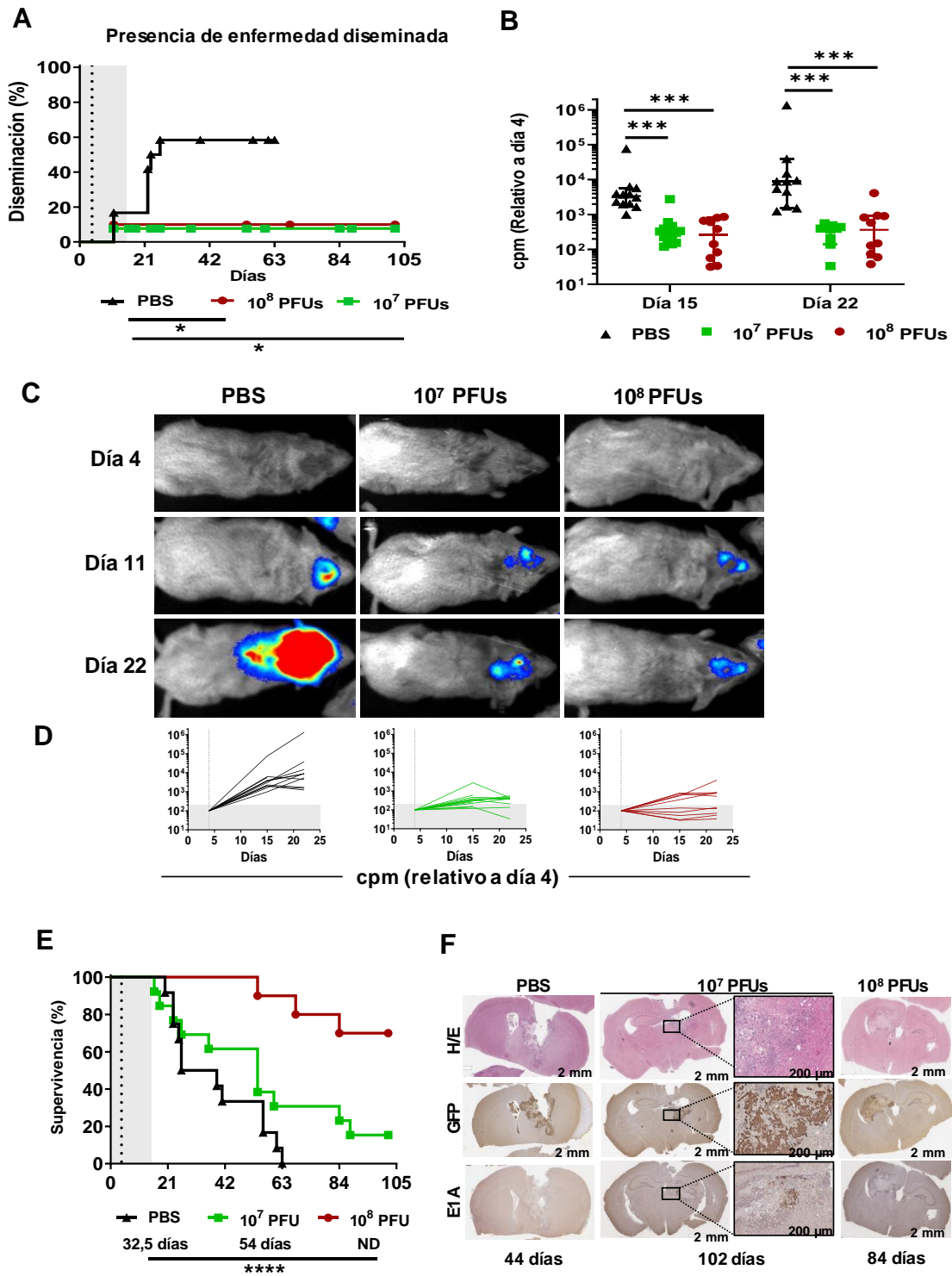


Figura 12. Delta-24-RGD dificulta el desarrollo de lesiones AT/RT diseminadas. (A) Gráfico de Kaplan-Meier que compara el desarrollo de tumores secundarios de AT/RT BT-12. Grupo con tratamiento con 10^7 PFU/ratón vs grupo PBS $p = 0,0166$; 10^8 PFU/ratón vs grupo PBS $p = 0,0291$ (prueba de rango logarítmico). Los puntos en las curvas de supervivencia indican eventos de muerte. (B) Análisis de las diferencias en el tamaño de los tumores entre los tres grupos experimentales en los días 15 y 22 después de la inyección de células tumorales. Cada punto representa un valor individual, y las barras indican la mediana de recuentos totales por minuto (cpm) con un IC del 95% (prueba de Kruskal-Wallis, corrección de Dunn). (C) Imágenes representativas del desarrollo de los tumores diseminados en los ratones a día 4 (día del tratamiento), 11 y 22 después de la implantación de las células BT-12-luc. (D) Evolución del crecimiento tumoral medido como señales de luminiscencia en ratones tratados con 10^7 , 10^8 PFU de Delta-24-RGD y tratados con PBS. Los recuentos totales por minuto (cpm) medidos en todo el ratón se normalizaron con respecto a la intensidad de la señal del día del tratamiento (línea vertical discontinua). (E) Comparación de las curvas de supervivencia entre los ratones portadores de tumores BT-12 intraventriculares que fueron tratados de forma simulada (PBS) o con 10^7 o 10^8 PFU de Delta-24-RGD (prueba de rango logarítmico). Las líneas verticales discontinuas en los gráficos de supervivencia indican la administración de Delta-24-RGD. (F) Análisis histológico de los tumores; H/E, GFP y la proteína viral E1A.

9. EL VIRUS DELTA-24-RGD INCREMENTA LA SUPERVIVENCIA EN UN MODELO INMUNOCOMPETENTE DE AT/RT

A la hora de diseñar nuevas estrategias terapéuticas es necesario comprender las interacciones existentes entre las células tumorales y las inmunitarias. Con ello, podremos evitar la evasión de las células tumorales del sistema inmune y mejorar las respuestas a los tratamientos de inmunoterapia. Estudios clínicos y preclínicos previos han aportado pruebas de que Delta-24-RGD mejora la respuesta inmunitaria antitumoral en los tumores cerebrales^{79,133}. Por ello, decidimos evaluar el efecto de este adenovirus en un modelo inmunocompetente tras la implantación de células de AT/RT. La falta de acceso a este tipo de modelo, ya de por sí, escasos, nos ayudó a decidimos por la adquisición de ratones NSGTM-SGM3 humanizados con células progenitoras hCD34+ (huCD34-NSGTM-SGM3), que recapitulan el sistema inmune innato y adaptativo¹³⁴. Además, a diferencia de los modelos singénicos murinos, estos modelos permiten la utilización de células humanas, lo que nos permite evaluar el efecto del adenovirus sobre el sistema inmune en un contexto permisivo para la replicación.

Los ratones NSGTM-SGM3 son un huésped probado para la reconstitución de un sistema inmune de origen humano tras el trasplante de células madre hematopoyéticas¹³⁵. HuCD34-NSGTM-SGM3 son creados a partir de ratones *NSG-SGM3 (NOD scid gamma)*

irradiados de manera subletal a las 3-4 semanas de edad, seguidos de una inyección por cola de CD34+ HSC humanas (*hematopoietic stem cells*) aisladas de sangre de cordón umbilical. A las 12 semanas post-trasplante se extrae sangre periférica del ratón y se confirma la humanización del ratón por citometría de flujo usando marcadores para los distintos linajes celulares tales como: leucocitos humanos y murinos (hCD45/mCD45), linfocitos B (hCD19), linfocitos T (hCD3) y células mieloides (hCD33) (**Figura 13**).

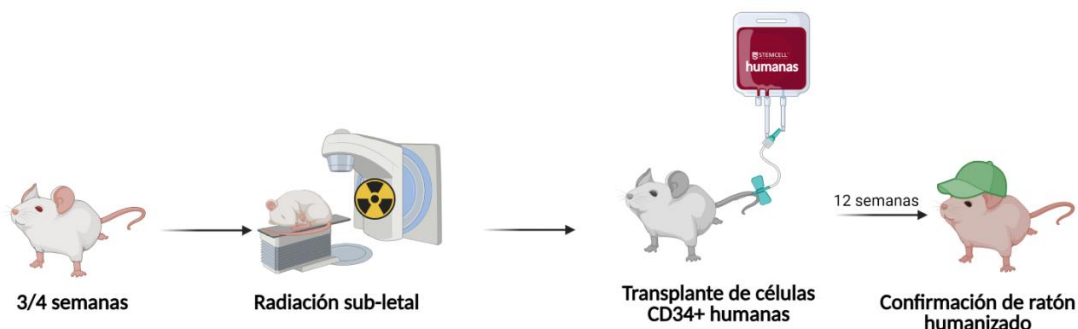


Figura 13. Descripción gráfica del proceso de humanización de ratones *NSG-SGM3*.

Para evitar los posibles problemas de reconocimiento linfocito-tumor por incompatibilidad entre los HLAs, idealmente se deberían usar células hematopoyéticas y células tumorales del mismo paciente. Sin embargo, al tratarse de tumores raros pediátricos esta opción no era viable por la escasez de casos y la dificultad de obtener suficientes células CD34+ de estos mismos pacientes para llevar a cabo nuestros experimentos de supervivencia. Por esa razón nos decidimos a utilizar ratones humanizados comerciales. El proveedor de estos animales (*The Jackson Laboratory-JAX West*) nos facilitó una lista con la descripción de los HLAs de los donantes de células progenitoras hCD34+ con el que habían sido humanizado los diferentes lotes de ratones, aunque esta información sólo recogía el HLA-A del donante. Con el objetivo de intentar encontrar, al menos, una compatibilidad parcial determinamos el HLA de nuestras tres líneas tumorales de AT/RT (**Tabla 1**). Lamentablemente, ningún lote de ratones NSG-SGM3 humanizados tenía HLA-A compatible con ninguna de nuestras líneas de AT/RT, lo cual deberá ser tenido en cuenta a la hora de interpretar los resultados. La elección de los ratones se basó en la edad y el número de animales disponibles de cada lote, ya que no queríamos realizar un experimento con animales con distinto donante y, así, evitar variables dentro de nuestro estudio. Debido a ello, los

ratones para el experimento de supervivencia y mecanismos procedían de diferente donante, con **HLA-A *02:01; *68:02** y **HLA-A *02:01; *24:02**, respectivamente.

BT-12	A*11:01,*23:01	B*55:01,*58:01	C*04:03,*07:01	DRB1*04:07,*13:02
CHLA-06	A*02:06,-	B*39:08,-	C*07:02,-	DRB1*04:07,-
CHLA-266	A*31:01,*68:01	B*39:06,*48:01	C*07:02,*08:01	DRB1*04:04,-

Tabla 1. Descripción de los HLAs de las tres líneas celulares de AT/RT.

En cuanto a la elección del modelo tumoral tuvimos en cuenta que los ratones humanizados son especialmente sensibles a las cirugías, lo que nos llevó decidimos a utilizar el modelo supratentorial ya que supone una intervención quirúrgica menos agresiva. Se trata de una cirugía más tolerable por su localización anatómica, donde el animal apenas sangra y su recuperación es más rápida. Respecto a la elección de la línea tumoral nos decantamos por la CHLA-06 (**HLA-A *02:06**) ya que posee una cinética adecuada para nuestro experimento. La cinética de la línea CHLA-266 es larga y, debido a la edad de los ratones, necesitábamos unas células que desarrollaran el tumor en un tiempo corto. La línea BT-12 no es apta para el desarrollo de tumores en esta localización.

Para evaluar el efecto antitumoral del Delta-24-RGD en estos ratones, se inocularon las células CHLA-06 y se trataron con una sola dosis del virus (10^8 PFUs). El patrón de cirugía, implantación de células e inoculación del adenovirus Delta-24-RGD fue el mismo que en los modelos inmunodeprimidos. Los ratones tratados con el Delta-24-RGD aumentaron significativamente su mediana de supervivencia comparándolo con el grupo control (PBS) ($p = 0,0345$), siendo la supervivencia del grupo control 23 días y 34 la del grupo tratado con el adenovirus (**figura 14.A**). El peso de los animales se monitorizó durante el experimento para determinar si la inyección del virus en un contexto inmunocompetente podía dar lugar a toxicidad por respuesta inflamatoria exacerbada. Sin embargo, no se observaron diferencias entre grupos experimentales durante los primeros 15 días, lo que nos informa de que, los animales tratados no muestran signos de toxicidad asociados a la inflamación inducida por el Delta-24-RGD. Con el avance de la enfermedad los ratones controles fueron perdiendo más peso respecto a los ratones tratados con el adenovirus, siendo significativamente mayor los pesos en el grupo tratado respecto al grupo control al final del experimento ($p = 0,043$) (**figura 14.B**).

Los análisis histológicos de las muestras cerebrales de los ratones tras su sacrificio al final del experimento de supervivencia indicaron que el virus era capaz de infectar y replicarse en un contexto inmunocompetente ya que detectamos la presencia de las proteínas virales E1A y hexón (**Figura 14.C**).

Para confirmar y asegurarnos de que los ratones, a tiempo final, seguían manteniendo el sistema inmune de origen humano, tras el sacrificio de cada animal corroboramos la presencia, por citometría de flujo, de células CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, y CD45+ (humano y murino) en los bazos. El resultado nos informó de que todos los animales mantenían las poblaciones del donante al final del experimento.

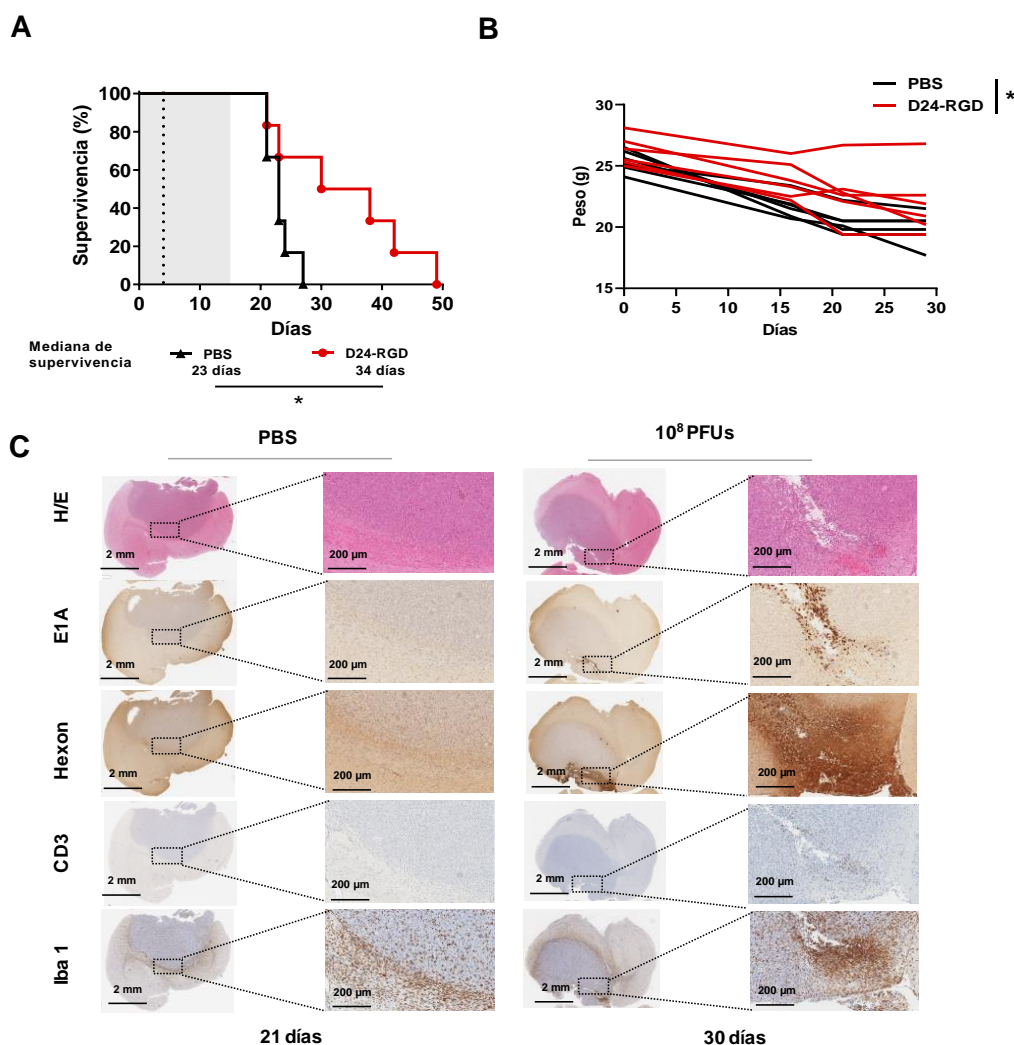


Figura 14. Delta-24-RGD incrementa la supervivencia en un modelo inmunocompetente de AT/RT. (A) Gráfico de supervivencia de los ratones tratados con 10^8 PFU de Delta-24-RGD respecto al grupo control (prueba de rango logarítmico). En la parte inferior del gráfico aparecen las medianas de la supervivencia global. La línea vertical discontinua indica el día de la administración de Delta-24-RGD. (B) Seguimiento del peso de los ratones tras el tratamiento. Cada línea representa un animal. Test ANOVA de dos vías. (C) Imágenes de las tinciones

histológicas de los cortes de cerebro de los ratones humanizados. Las muestras se tiñeron con H/E y se realizaron inmunotinciones contra las proteínas virales E1A y hexón, y los marcadores de células inmunitarias Iba-1 (microglía) y CD3 (linfocitos T).

Para valorar la respuesta inmunitaria del ratón en el tumor tras la implantación de las células y posterior tratamiento con Delta-24-RGD realizamos unos paneles de inmunofluorescencia multiespectral de diferentes poblaciones inmunitarias emplazadas en el margen y el centro del tumor (**Figura 15.A**). El panel desarrollado estaba compuesto por los siguientes marcadores: linfocitos T (CD3+), linfocitos T citotóxicos (CD8+), linfocitos B (CD20+), microglía (CD11b+) y macrófagos/microglía (CD68+). La inmunofluorescencia multiespectral se validó mediante IHC convencional de cada marcador (**Figura 15.B**).

Los resultados nos revelan que las células inmunes formadas sobre todo por los linfocitos T CD8+ y CD11b+ se acumulaban en el margen invasivo del tumor y en las regiones que contenían Delta-24-RGD. De hecho, el marcador de microglía delimita perfectamente los márgenes del tumor (**Figura 15.C**). Realizada la cuantificación de las poblaciones inmunitarias analizadas (CD3⁺, CD8⁺, CD11b⁺, CD20⁺, CD68⁺), se concluye que la presencia de linfocitos B CD20⁺ era casi insignificante, tanto en los ratones tratados con Delta-24-RGD como en los tratados con PBS (**Figura 15.D**). El tratamiento con el adenovirus disminuyó significativamente la presencia de células CD68⁺ (macrófagos) en el tumor ($p = 0,047$) aunque esta reducción fue menos pronunciada en el margen invasivo. El anticuerpo utilizado en este caso reconoce exclusivamente macrófagos humanos, lo que nos indica, que lo que estamos detectando proviene del donante. Por lo tanto, estas poblaciones de CD68⁺ detectadas en el cerebro del ratón no son propias de la microglía del animal, sino macrófagos humanos reclutados y movilizados por el tumor.

No se observaron diferencias en cuanto a la población mieloide total CD11b⁺, aunque el anticuerpo que se utilizó también detecta el ortólogo murino; por lo tanto, esta evaluación puede haberse visto obstaculizada por la gran abundancia de microglía del ratón (**Figura 15.D**). El nivel de células T total (CD3+) es alto en general, centro y margen del tumor, pero sin diferencias entre los grupos. Curiosamente, los niveles de CD8+ en el grupo control son prácticamente nulos, lo cual nos informa de que los linfocitos hallados eran mayoritariamente CD4+ (CD3+/CD8-). Tras el tratamiento con el Delta-24-RGD, se produjo un notable aumento de la subpoblación CD8⁺ siendo

significativo en el caso de la población CD8+ total ($p = 0,004$), como en el margen del tumor ($p = 0,034$). Con los datos obtenidos vemos que los cambios producidos por el adenovirus Delta-24-RGD son mayoritariamente dentro de las poblaciones CD8+.y CD68+.

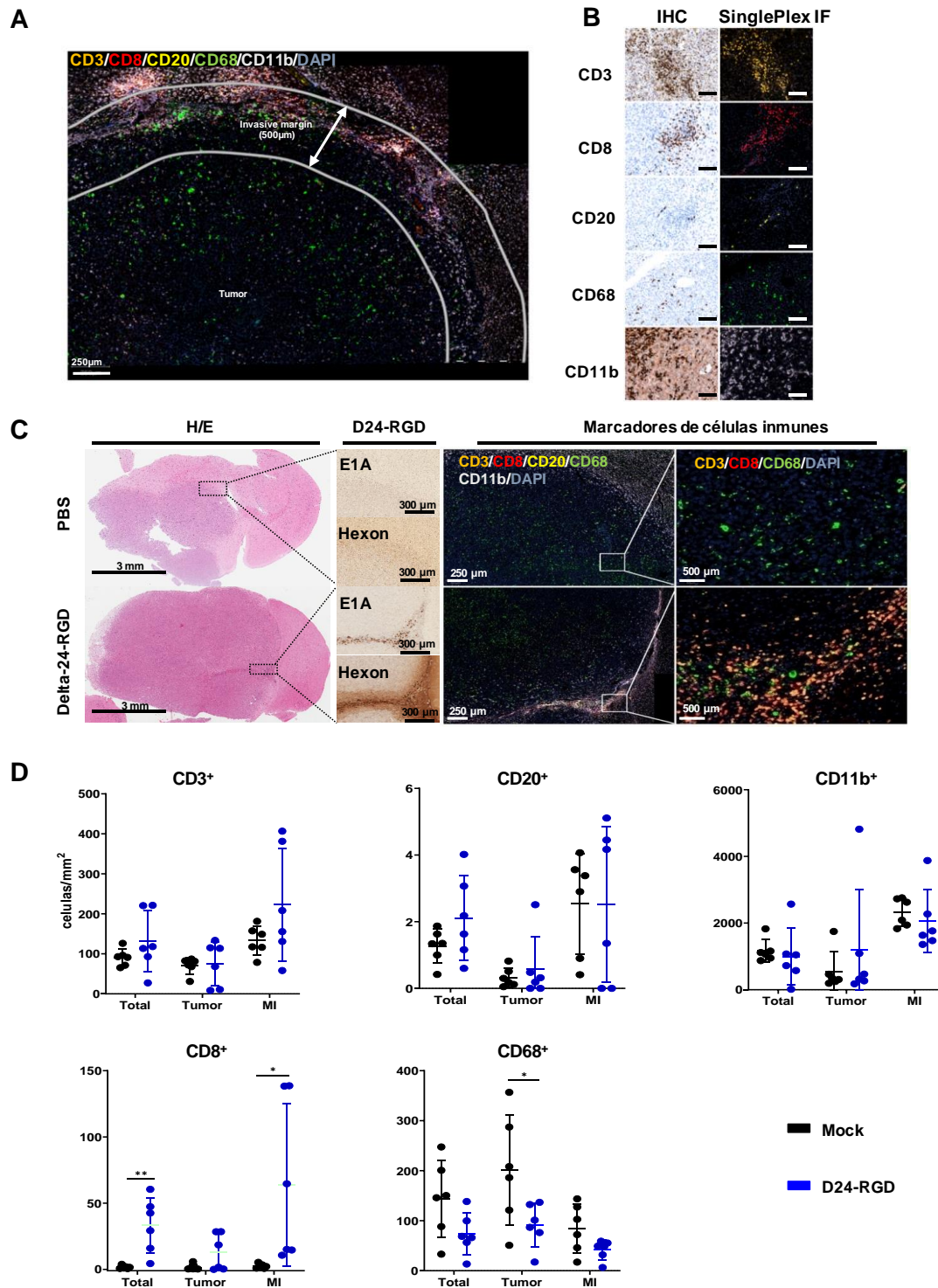


Figura 15. Delta-24-RGD provoca un cambio del paisaje inmunológico en ratones humanizados inmunocompetentes portadores de AT/RT. (A) Representación de la definición de las regiones del margen y centro tumoral. (B) Validación de la técnica multiespectral con IHC convencionales individuales. Las líneas negras/blancas representan una escala de 300 μm (C) Imágenes representativas de cortes de cerebro obtenidos de ratones humanizados portadores de tumores CHLA-06. Las muestras se tiñeron con hematoxilina-eosina (H/E) y se inmunotñeron contra las proteínas virales, E1A y hexón; además se sometieron a inmunofluorescencia multiespectral para detectar los siguientes marcadores celulares inmunitarios: CD3 (naranja), CD8 (rojo), CD20 (amarillo), CD68 (verde) y CD11b (blanco). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). (D) Cuantificación de las poblaciones de células inmunes obtenidas mediante inmunofluorescencia en todo el tumor (total), en la región central del tumor (tumor) y en el margen invasivo del tumor (MI). Las barras indican la media \pm DE (n=6), y se utilizaron pruebas t de Student para las comparaciones entre los tratamientos con PBS (negro) y Delta-24-RGD (azul) en cada región.

Para completar el estudio de la respuesta inmunitaria, caracterizamos mediante citometría de flujo las poblaciones de células T en bazo, ganglios linfáticos cervicales y en linfocitos infiltrantes de tumor (*TIL*) 15 días después del tratamiento. Durante la realización de este experimento perdimos varios de los ratones ya que son muy sensibles a la anestesia, dejando solo dos ratones por grupo. Debido a la complejidad de estos experimentos decidimos seguir adelante para tener una idea de lo que estaba sucediendo, aunque por supuesto, no podemos sacar conclusiones definitivas al no poder realizar estadística. Los resultados indican que Delta-24-RGD induce un incremento de linfocitos T, tanto en las poblaciones CD4⁺ como en CD8⁺ en *TIL* (**Figura 16.B**). Tras el estudio del fenotipo de estas poblaciones analizando diferentes marcadores de activación/agotamiento se observó que el tratamiento adenoviral promovía en los linfocitos CD8⁺ un ligero incremento del marcador de activación (CD137) y de los marcadores de agotamiento (TIGIT y TIM3). Cabe destacar también dentro de esta población de CD8⁺, la gran cantidad de expresión de PD-1 en ambos grupos, sin que exista diferencia entre ellos. En el análisis de la población de CD4⁺ no vimos diferencias (**Figura 16.B**).

Tras el análisis de las muestras de bazos y nódulos linfáticos, no se apreciaba ninguna diferencia entre el grupo control y el tratado con Delta-24-RGD.

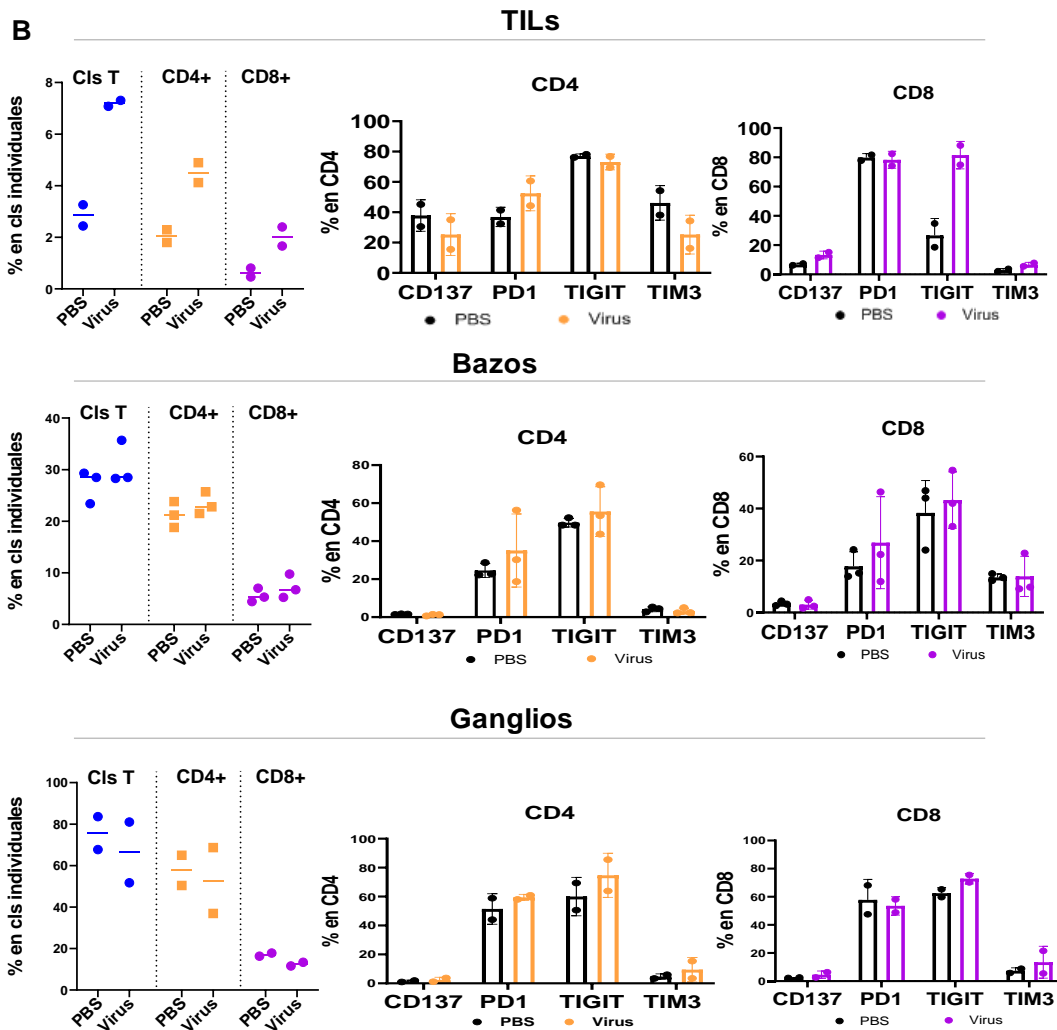
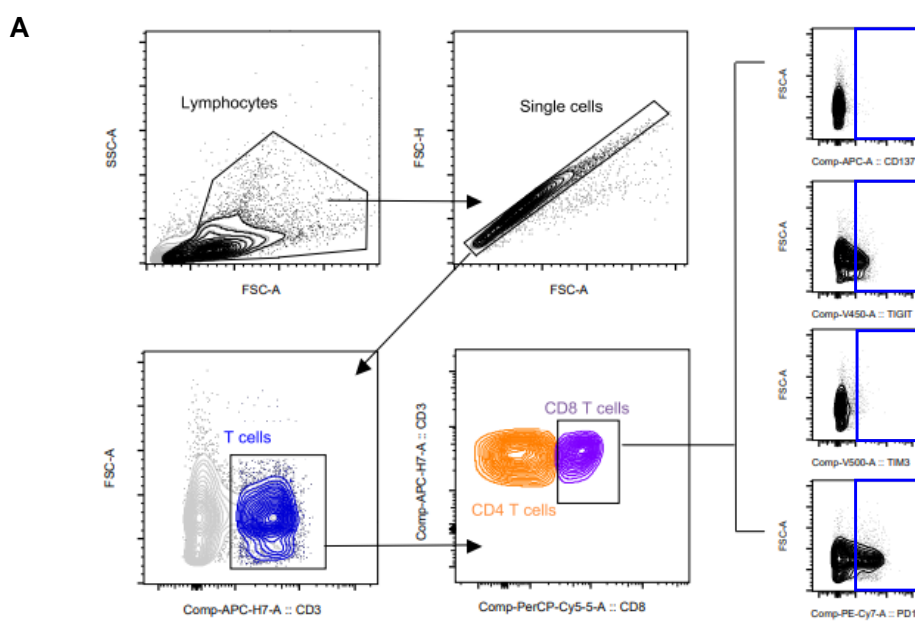


Figure 16. (A) Representación de la estrategia en la selección de las poblaciones en el análisis de citometría de flujo. (B) Gráficos de cuantificación de las diferentes subpoblaciones inmunitarias (CD137, PD1, TIGIT y TIM3) tanto a nivel de células totales (CIs), como dentro de las poblaciones CD8+ y CD4+, en TILs, bazos y ganglios linfáticos.

El análisis de este proyecto piloto con ratones humanizados pone de manifiesto que el tratamiento con el adenovirus Delta-24-RGD desencadena una respuesta inmunitaria a nivel local, pero no es apreciable a nivel sistémico o ganglionar. Quizás, por la gran cantidad de expresión de PD-1 en los tiempos de sacrificio de los ratones para este estudio haya sido un poco tardío. Por supuesto, es necesario ampliar este estudio buscando un modelo con ratones inmunocompetentes que nos recapitule mejor la respuesta al tratamiento con Delta-24-RGD; ratones más jóvenes, sin dependencia al tipo de donante y capacidad de adquirir un número representativo de animales.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Debido a la baja prevalencia de los tumores cerebrales pediátricos, hasta recientemente no se habían abierto vías de investigación centradas específicamente en estos tumores. Como consecuencia de ello, los pacientes pediátricos han sido tratados con regímenes terapéuticos basados en los de adultos, resultando poco beneficiosos. Actualmente, es sabido que la biogénesis de estos tumores es totalmente diferente a la de los adultos, sin olvidar las diferencias biológicas propias entre pacientes pediátricos y adultos. Así pues, es necesario investigar y profundizar en los mecanismos que llevan a su desarrollo para poder aplicar los tratamientos más adecuados, y buscar nuevas herramientas terapéuticas que ayuden a mejorar la supervivencia y la calidad de vida de estos niños. El objetivo de nuestro laboratorio es abrir líneas de investigación específicas para los tumores sólidos pediátricos más comunes desarrollando modelos relevantes para estos pacientes.

A pesar de los avances en el conocimiento de sus características moleculares, los tumores pediátricos del SNC siguen siendo la primera causa de muerte por cáncer, en niños de 0 a 16 años¹³⁶. A este tipo de tumores, además de su mal pronóstico, se unen los efectos secundarios que normalmente aparecen tras los tratamientos tradicionales.

El tumor AT/RT es considerado un tumor “raro” y de los más agresivos del SNC que afecta a pacientes pediátricos¹⁶. El pronóstico de estos niños sigue siendo malo, sobre todo para los pacientes menores de 3 años, donde los tratamientos convencionales (radioterapia, cirugía y quimioterapia) se ven limitados por las graves secuelas que pueden llegar a producirse. De esta manera, la mediana de supervivencia de los niños afectados por AT/RT no supera los 10 meses²¹.

Este trabajo se centra en caracterizar el efecto del adenovirus oncolítico Delta-24-RGD como nueva herramienta terapéutica para el tratamiento de los AT/RT. El objetivo final es encontrar estrategias alternativas eficaces y seguras para estos pacientes que, a día de hoy, no tienen opciones terapéuticas viables.

La utilización de VO como terapia antitumoral se lleva estudiando desde hace décadas, pero es a partir de 2005 cuando comienza a tener un gran interés en la comunidad científica, reflejado en el aumento de publicaciones relacionados con la viroterapia¹³⁷.

La aprobación por la FDA de T-VEC (herpes que codifica GM-CSF) para uso clínico en pacientes con melanoma metastásico ha supuesto un avance en la aplicación clínica de los virus oncolíticos para el tratamiento de tumores sin opciones terapéuticas. La utilización de las terapias basadas en los VOs en los tumores cerebrales pediátricos son una buena opción para su tratamiento, más si cabe después de los buenos resultados mostrados, tanto en seguridad como en tolerancia, en estudios pre-clínicos y clínicos^{66,77,110,111,138}. Estos trabajos nos demuestran que tras los tratamientos basados en viroterapia, además de observarse un efecto oncolítico, existe una eficacia terapéutica mediada, también, por la inducción de respuestas inmunitarias antitumorales⁶⁶.

Una herramienta terapéutica muy prometedora es la utilización de adenovirus condicionalmente replicativos (CRAds). Las principales características de estos adenovirus modificados incluyen, su alta capacidad de amplificación, lo cual permite extender su efecto oncolítico por el tumor y, por otro lado, su replicación está restringida a las células tumorales, evitando, en gran medida, afectar a las células sanas¹⁰⁸. Los adenovirus oncolíticos pueden modificarse y adaptarse fácilmente para aumentar la selectividad, la potencia de la transducción y la replicación del vector en las células cancerosas. Así surgió el adenovirus Delta-24-RGD (DNX-2401 en la clínica)¹⁰⁸, cuya modificación impide su replicación en células con la vía *Rb1* intacta debido a la incapacidad del E1A mutante de unirse a la proteína pRb. En nuestro laboratorio hemos demostrado en modelos murinos de DIPG⁷⁶ y pHGG¹³⁹ que el tratamiento con Delta-24-RGD incrementa la supervivencia de los ratones e induce una respuesta inmune antitumoral. Gracias al desarrollo de diferentes ensayos clínicos (NCT00805376, NCT01956734, NCT03178032), uno de ellos para el tratamiento de DIPG¹¹³, se ha confirmado que la utilización del adenovirus DNX-2401 como terapia es segura y, en general, beneficiosa para los pacientes.

Con todos estos estudios previos decidimos analizar, por un lado, si el tumor AT/RT era un buen candidato para el tratamiento con el adenovirus Delta-24-RGD y por otro, evaluar su eficacia en modelos preclínicos que recapitulan las características de los AT/RTs.

Lo primero que hicimos fue evaluar si este tipo de tumores son adecuados para la infección por el virus. Puesto que el Delta-24-RGD requiere heterodímeros de integrinas $\alpha_v\beta_3$ o $\alpha_v\beta_5$ en la célula diana para su infección, el análisis *in silico* demuestra que el

virus será capaz de internalizarse a través de dímeros de integrinas $\alpha_v\beta_5$, cuyos genes sí se expresan en este tipo de tumores, a pesar de la expresión casi nula de la integrina β_3 . A estos datos hay que añadir que, en estos tumores, la expresión de CAR (*CXADR*), principal receptor de reconocimiento del Ad5, presenta unos niveles superiores a los observados en las muestras de cerebros normales. Estudiando la expresión de estos receptores por subgrupos de AT/RT, vemos que el de más alta expresión de CAR respecto a las muestras normales, es el subgrupo **AT/RT-MYC**, subgrupo al que pertenecen las tres líneas celulares utilizadas en el desarrollo de este trabajo. Los resultados obtenidos por citometría de nuestras líneas celulares, corroboran estos datos, obteniendo una elevada expresión del receptor CAR (60-99%) y de heterodímero $\alpha_v\beta_5$ (71-90%), datos que posibilitan, por un lado, la unión del adenovirus a la superficie celular y, por otro, la internalización del virus en célula diana⁹⁷, con lo que *a priori*, los tumores de AT/RT son buenos candidatos para su estudio con Delta-24-RGD.

Como hemos explicado anteriormente, una de las ventajas de los adenovirus es su amplificación y expansión por el tumor, pero para ello tiene que ser capaz de replicarse. Hemos comprobado *in vitro* que el virus es capaz de replicarse de manera eficaz en las tres líneas de AT/RT y, además, producir un efecto oncolítico que se ve incrementado al permitir un mayor número de ciclos de replicación. Esto demuestra que, aunque en las líneas celulares usadas en los experimentos no existan mutaciones directas en la vía de Rb, como nos ha informado el panel de NGS, la actividad de E2F-1 se encuentra incrementada de manera muy significativa, lo que nos lleva a pensar que existirán otras vías alteradas que afecten al desarrollo de su actividad normal. En el análisis *in silico* aportado por el Dr. Marcel Kool comprobamos que los niveles de expresión de *E2F-1* en AT/RT eran más elevados que en las muestras normales, y además existían alteraciones en los niveles de otros genes involucrados en su regulación, como *CDK4*, *CDK6*, *CCND1* (ciclina D1) y *RBI*, indicando la existencia de una desregulación del ciclo celular¹²⁸. A estos datos hay que añadir la firma particular de los AT/RTs; la delección del gen de supresión tumoral *SMARCB1* o *SMARCA4*^{26,140}. Esta característica, por sí misma, ya confiere una desregulación la vía p16-Rb a nivel epigenético^{29,38}, afirmando nuestra decisión de continuar en el estudio de estos tumores con el adenovirus Delta-24-RGD.

Con nuestros resultados *in vitro* hemos podido comprobar la gran capacidad de replicación del Delta-24-RGD demostrando que, a pesar de considerarse a los AT/RTs

tumores “frios”, son sensibles al virus. Estos datos amplían el espectro de tumores candidatos a tratamiento con el adenovirus, sin el requerimiento de contar con una alta carga mutacional.

Todos nuestros estudios *in vivo* en modelos de AT/RT humano en ratones inmunodeprimidos han mostrado un incremento de la supervivencia, incluso en tumores ya avanzados (modelo de tumor establecido). Existe presencia de adenovirus tras el sacrificio de animales, incluso a 100 días después de la administración, lo que nos informa de la gran capacidad de replicación y expansión del adenovirus en este tipo de tumor dentro de este modelo murino. Una desventaja de este modelo inmunodeprimido es el no poder estudiar el rol del sistema inmunológico en la progresión del tumor ni ante la presencia del virus. El primer ensayo clínico de fase I en gliomas recurrentes, demostró que DNX-2401 se replica y se extiende dentro del tumor en los pacientes, produciendo una oncolisis directa inducida por el virus⁷⁹, lo que nos informa de la permisividad de las células tumorales hacia el virus en este tipo de tumor cerebral, siempre teniendo en cuenta que se trata de adultos, donde el sistema inmunológico difiere del pediátrico^{141,142}.

La puesta a punto del modelo diseminado fue un reto, ya que no se había desarrollado este modelo utilizando el sistema “guide screw”. La validación de modelo y la implantación de células GFP/luc positivas que permitían el seguimiento de la enfermedad nos llevó a realizar un experimento de supervivencia con un número elevado de animales. Los resultados fueron toda una sorpresa ya que tras el tratamiento con la dosis más alta de Delta-24-RGD conseguimos un 70% de supervivientes de largo tiempo ($p < 0,0001$). Este modelo es muy importante dentro del estudio de los tumores de AT/RT ya que la mayoría de los niños presentan enfermedad diseminada en el momento del diagnóstico (71% en menores de 3 años²¹). Además, el 58% de los pacientes presentan diseminación cráneo-espinal¹⁴³ al fallecimiento. En 2012 Studebaker *et al.* publicaron los resultados obtenidos en un modelo murino diseminado de AT/RT tras el tratamiento con el virus del sarampión (*measles virus*)⁸⁴. Los animales tratados aumentaron significativamente su supervivencia respecto al grupo control, pero el tratamiento se realiza a los tres días de la implantación de las células tumorales, en nuestro caso, a los cuatro. Creo que es necesario ampliar los estudios dentro del modelo diseminado realizando el tratamiento una vez que la enfermedad se encuentra establecida a lo largo de diferentes regiones del SNC, en particular, en la médula

espinal. Así se recapitula de manera más fidedigna la situación en la clínica de esta enfermedad. Para ello, hemos pensado en reducir el número de células tumorales inoculadas en el ventrículo (realizar una cinética), y de esta manera, dar tiempo a las células tumorales circulantes por la médula a instalarse y desarrollar un tumor diseminado, antes de que el animal sea sacrificado debido al rápido avance del tumor primario. Confirmada la diseminación en el ratón, se comenzaría su tratamiento con la administración del Delta-24-RGD en el ventrículo lateral derecho. Respecto a este modelo, también estamos desarrollando una línea celular capaz de crear metástasis de manera espontánea. Para ello, implantamos intracerebroventricularmente (ICV) las células BT-12 GFP/luc y tras la detección por luminiscencia de la metástasis, sacrificamos al ratón para extraer las células tumorales diseminadas por la médula. Una vez en cultivo, las células son aisladas y clasificadas para derivar clones con un mayor potencial de diseminación.

Uno de los regímenes de tratamiento en los tumores de AT/RT es la administración de quimioterapia intratecal (IT), tanto para evitar la diseminación del tumor primario como para tratar la enfermedad ya diseminada. Consiste en la administración de la quimioterapia directamente en el líquido cefalorraquídeo (LCR) permitiendo que ésta llegue a las posibles células tumorales, además de minimizar los posibles efectos secundarios sistémicos que suele producir la quimioterapia intravenosa. En el caso del Delta-24-RGD, esta vía de administración no puede aplicarse en clínica ya que la administración de los virus en el ventrículo cerebral puede producir inflamación y desarrollar encefalitis e incluso meningitis¹⁴⁴. De hecho, lesiones situadas cerca o adyacentes al ventrículo constituyen un criterio de exclusión en diversos ensayos de adultos con glioblastoma tratados con virus oncolíticos^{78,79}.

En los ensayos clínicos basados en el tratamiento con DNX-2401 o DNX-2440 la administración se realiza mediante inyección intratumoral, la cual debe realizarse mediante cirugía estereotáctica, lo que supone una cirugía invasiva que dificulta la repetición del tratamiento a corto plazo. Una alternativa de administración sería la sistémica (intravascular), como las mayoría de las terapias, pero presenta varios problemas: 1- Delta-24-RGD posee un gran tropismo por el hígado, lo que disminuye su biodisponibilidad¹⁴⁵; 2- como su origen es el Ad5 la mayoría de las personas ya poseen anticuerpos neutralizantes preexistentes contra él, lo que dificulta que el virus pueda llegar a su tejido diana aunque en niños menores de 12 años la prevalencia es mucho

más baja¹⁴² y 3- el adenovirus no atraviesa la barrera hematoencefálica¹⁴⁶. Para poder aplicarlo de manera sistémica y evitar estos obstáculos se han estudiado estrategias que permitan transportar el adenovirus de forma segura y dirigida al tumor. Una de ellas es la utilización de células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea del paciente (hMSC) cargadas con Delta-24-RGD, hMSC- Δ 24^{147,148}. Otra estrategia para dirigir los adenovirus, consiste en la infusión intravenosa de células tumorales autólogas transfectadas con el adenovirus oncolítico. Se ha observado que las células tumorales infundidas alcanzan las metástasis y el virus destruye las lesiones tumorales con mínima toxicidad¹⁴⁹. Otra estrategia utilizada por Ana Mato-Berciano *et al.* para proteger al virus del ataque de los anticuerpos neutralizantes (Nabs), es la adicción en la cápside viral de un dominio de unión a la albúmina (ABD). Este dominio se une a la albúmina sérica formando un escudo de albúmina (ABS) que protege al adenovirus oncolítico VCN-11 de los Nabs, permitiendo una administración sistémica repetida eficaz. VCN-11 también expresa PH20 hialuronidasa permitiendo al virus destruir la matriz extracelular, favoreciendo la diseminación viral¹⁵⁰. Estas características hacen de VCN-11 un candidato prometedor y seguro para probar su readministración en ensayos clínicos. En base a estos datos, es necesario realizar estudios pre-clínicos cambiando el esquema o la vía de administración del tratamiento para intentar crear un modelo más representativo y capaz de mejorar el pronóstico en este grupo de pacientes con presentación de enfermedad diseminada.

La potenciación de la respuesta anti-tumoral del sistema inmunológico del paciente es, actualmente, uno de los pilares en la lucha contra el cáncer⁶⁸. Para poder estudiar el papel que ejerce el sistema inmunológico tras la implantación de células de AT/RT y su posterior tratamiento, es necesario un modelo singénico inmunocompetente. Se han desarrollado varios modelos de ratón delecionando *SMARCB1* para reproducir la enfermedad de AT/RT y el tumor rabdoide^{151,152}. En los modelos se ha podido comprobar que la eliminación del gen *SMARCB1* debe realizarse durante el desarrollo embrionario entre los días 6 y 10 (E6–E10) para que el tumor posea características típicas de un tumor rabdoide. Si esta ablación se realiza después del nacimiento, los ratones desarrollan linfomas, lo que indica que se requiere una ventana de desarrollo temprana restringida para el inicio de los tumores rabdoides intracraneales. Curran *et al.*¹⁵¹ descubrieron que cuando delecionaban *SMARCB1/p53* en células progenitoras positivas para la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), el patrón de expresión de los

tumores desarrollados en los ratones tras su implantación recapitulaba el de los AT/RT humanos, representando primer modelo de ratón genéticamente diseñado (*GEM*) para AT/RT en el SNC. Han *et al.* han conseguido crear tumores espontáneos de AT/RT con un modelo de ratones transgénicos *Smad4*^{flox/flox}; Rosa26-Cre^{ERT2} en los que se induce la delección bialélica de *SMAD4* mediante la administración de tamoxifeno durante su desarrollo embrionario (E6-E7)¹⁵². Con este sistema de ratones transgénicos, también se ha conseguido un modelo singénico (R26S1 y R26S2) de tumores rabdoideos derivados de *Smad4*^{flox/flox}, Rosa26-Cre^{ERT2} donde se mantenían los tumores injertados subcutáneamente en el flanco de ratones C57Bl/6J¹⁵³. Todos estos modelos inmunocompetentes presentan algunos problemas para llevar a cabo nuestros ensayos; la mayoría de estos ratones no viven más de unos pocos días después de nacer, lo que imposibilita realizar estudios de eficacia antitumoral. Las distintas terapias para poder tratar los tumores en estos modelos tendrían que ser de una manera sistémica, ya que, siendo la aparición de tumores en el periodo embrionario, administrar el tratamiento intratumoralmente sería prácticamente imposible por la dificultad que resulta localizar y acceder al tumor. Todo esto, unido a la dificultad de disponer uno de estos modelos de AT/RT, nos llevó a decidimos por la utilización de ratones con un sistema inmune humanizado. La funcionalidad del sistema inmunitario de los ratones humanizados ha sido validada en estudios donde han demostrado el rechazo de aloinjertos de islotes de Langerhans humanos¹⁵⁴ y de xenoinjertos de piel de ratón¹⁵⁵ por incompatibilidad con el HLA. Pero también se ha comprobado que los ratones HuNSG no tienen capacidad de rechazar tumores cuando existe un emparejamiento parcial con el HLA. En el trabajo de Minan Wang *et al.* utilizaron este tipo de ratones para realizar xenoinjertos derivados de pacientes (*PDX*) de diferentes tumores y comprobaron que los tumores humanos *PDX* podían crecer en ratones HuNSG con sistema inmunitario humano alogénico parcialmente compatible con HLA¹⁵⁶.

Los ratones HuCD34-NSGTM-SGM3 nos permiten utilizar modelos de AT/RT en un entorno inmunocompetente y, a su vez, estudiar los cambios de la respuesta inmunitaria tras el tratamiento con Delta-24-RGD en un contexto permisivo para la replicación del virus. Esto último no sería posible en un modelo inmunocompetente de ratón, ya que este adenovirus no es capaz de replicarse en células murinas¹⁵⁷, como hemos podido comprobar en nuestro laboratorio con otro tipo de tumores (DIPG y pHGG). Por otro lado, hay que tener en cuenta, debido al largo proceso de humanización del ratón, los

animales tienen entre 22 y 24 semanas de vida en el momento de comenzar nuestros estudios, considerándose a los ratones en edad no pediátrica. Conforme el envejecimiento, se produce una reducción en la efectividad del sistema inmunitario debido a la disminución del número de precursores de los linfocitos B¹⁵⁸. Este es un ejemplo para indicar que las respuestas inmunológicas de estos ratones adultos no serán iguales que las que nos proporcionaría un modelo inmunocompetente pediátrico.

La elección de los ratones humanizados según el donante más adecuado para la implantación de la línea AT/RT, no fue fácil, como describo en los resultados. Al no existir ninguna partida de ratones con el mismo perfil de HLA que nuestras líneas celulares, no podemos interpretar de forma definitiva la respuesta inmunológica de estos ratones ya que, por falta de compatibilidad de HLA, el reconocimiento linfocito-tumor no puede darse.

Uno de nuestros objetivos era el estudio de las diferentes poblaciones inmunitarias en bazo, ganglios linfáticos y linfocitos infiltrantes de tumor (*TILs*) 15 días post tratamiento con Delta-24-RGD o PBS para poder elucidar los cambios que induce el virus. Debido a la sensibilidad de estos ratones a los procesos quirúrgicos el número de ratones para este experimento se quedó reducido a dos por grupo, lo cual impide obtener ideas concluyentes en cuanto a respuestas inmunitarias. Aun así, analizando los resultados del experimento pudimos comprobar que el porcentaje de células T infiltradas en el tumor, se duplicaba cuando se trataban con el adenovirus, aumentando tanto las poblaciones de CD4+ como de CD8+. Teniendo en cuenta que los tumores cerebrales infantiles son considerados tumores “fríos”, es decir, tumores con baja carga mutacional y con una escasa infiltración de linfocitos T³⁵, creemos que este aumento en el porcentaje de linfocitos CD4+ y CD8+ tras la administración del Delta-24-RGD es un dato positivo, ya que el virus es capaz de reclutar linfocitos en el tumor. Realizamos un fenotipado de estos linfocitos analizando marcadores de activación/agotamiento y nos llamó la atención la gran cantidad de PD1 positivas dentro de los CD8+, con una expresión del 80% tanto en el grupo control como en el tratado. Esto nos sugiere que los linfocitos presentes a día 15 en el microambiente tumoral se han activado, pero también van acompañados, en el caso de los tratados, con un ligero aumento de los marcadores de agotamiento TIM3 y TIGIT. Este resultado junto a que no hemos observado diferencias en los marcadores de activación como CD137 nos lleva a pensar que, quizás, el momento elegido para el estudio del infiltrado tumoral (15 días post-tratamiento) no

es adecuado. Pensamos que sería necesario un estudio a 3 y 7 días, para analizar y fenotipar adecuadamente esta respuesta.

En el análisis del microambiente tumoral en los ratones del experimento de supervivencia mediante inmunofluorescencia multiespectral (*multiplex*) se pudo observar que la mayoría de las células inmunes se acumulaban en el margen invasivo del tumor (MI) y, sobre todo en las regiones que contenían Delta-24-RGD. La cantidad de linfocitos T totales (CD3+) no varía entre los dos grupos, pero, tras el tratamiento con Delta-24-RGD se produce un aumento significativo del número de CD8+ respecto al grupo control, donde prácticamente su presencia era nula. Esto nos informa de que la población de linfocitos T del grupo control estaba compuesto mayoritariamente por CD4+, sugiriéndonos que la respuesta inducida por el virus está basada en el reclutamiento de CD8+. Sin embargo, hay que tener en cuenta que al menos una parte de estos linfocitos serán específicos para epítomos virales. En este estudio se trató de determinar concretamente si el tratamiento con Delta-24-RGD aumentaba la respuesta de los linfocitos T específicos de tumor, realizando ELISPOT (*Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay*) para detectar y cuantificar células, en nuestro caso, secretoras de la citoquina IFN γ . Con ello, queríamos ver si los linfocitos estaban activados y en respuesta a qué, es decir, comprobar si el adenovirus es capaz de aumentar la respuesta antitumoral del sistema inmune. Este ensayo no se incluyó en este trabajo porque la técnica no fue válida y su repetición era imposible, debido a la dificultad de obtener nuevos ratones humanizados.

El papel que desarrollan los macrófagos asociados al tumor (TAMs) en los tumores tiene un largo recorrido. *Chen et al.* demostraron que el 40% de las células de masa tumoral en HGG en adulto estaban constituidos por TAMs, en la cual, la población más abundante era la de monocitos periféricos infiltrantes¹⁵⁹. Estas células a través de quimiocinas y factores de crecimiento promovían el crecimiento tumoral¹⁶⁰. Mientras estos TAMs promueven el crecimiento del tumor en gliomas, en meduloblastoma, tumor embrionario más común en niños, exhiben propiedades anti-tumorales¹⁶¹. Todos estos datos sugieren que el papel que desempeñan las TAMs son dependientes del tipo tumoral. *Viktoría et al*¹⁶², realizan un análisis del microambiente tumoral de los AT/RT observando que los TAMs son los leucocitos más abundantes en el nicho del mismo. Añaden que las células que expresan altos niveles del marcador específico CD68 MG/MAC (microglía/macrófago) fueron, con mucho, la población de células inmunes

más prevalente en el AT/RT. Realizaron una diferenciación entre pacientes con un alto o bajo nivel de células CD68⁺ infiltradas en el tumor, apareciendo una supervivencia significativamente más baja en el grupo con los niveles más altos de CD68⁺, siendo un factor pronóstico como ocurre en otros estudios de tumores sólidos^{163,164}. También realizan un análisis de RNA de AT/RT humanos y ven que la infiltración de CD68+ MAC en particular, en contraste con CD68+ MG, se asocia con un mal resultado.

En las muestras analizadas por inmunofluorescencia de los cerebros tras el experimento de supervivencia, nos encontramos que en los animales del grupo tratado con Delta-24-RGD aparecía una disminución de los macrófagos CD68+ infiltrados en el tumor, tanto en la evaluación total del tumor, como en los márgenes, pero significativamente más bajos en el centro tumoral. Estos datos (siempre teniendo en cuenta nuestro tamaño muestral), y con los datos de otros investigadores, apoyarían que la disminución de células CD68⁺ tras el tratamiento con Delta-24-RGD pueda contribuir al aumento de la supervivencia de nuestros ratones. Hay que tener en cuenta que los CD68+ detectados en los cerebros de los ratones provienen exclusivamente del donante humano y no de la microglía propia del cerebro del ratón, ya que su detección se realiza con un anticuerpo específico para el antígeno humano. No obstante, es necesario estudiar más profundamente el fenotipo de estos macrófagos para poder concluir si son pro o anti-inflamatorios.

Los datos preclínicos obtenidos en este trabajo tras el tratamiento de los AT/RT con el adenovirus nos informan de que el Delta-24-RGD da lugar a una clara actividad antitumoral, ampliando significativamente la supervivencia en todos los modelos murinos, llegando incluso, a ser capaz de evitar el desarrollo de enfermedad diseminada en estos tumores tan agresivos. Los resultados dentro de nuestro modelo con ratones humanizados sobre la estimulación y activación del sistema inmunológico tras este tipo de tratamiento son positivos y nos animan a poder buscar y experimentar en otro tipo de modelo inmunocompetente para esclarecer las respuestas inmunitarias que ya hemos podido encontrar en otros tipos de tumores pediátricos, como pHHG, DIPG y osteosarcomas^{76,111,139}.

En nuestro laboratorio, hemos trabajado con un adenovirus oncolítico distinto, VCN-01 (ICOVIR17K), en el tratamiento en otro tipo de tumor pediátrico de origen embrionario, CNS-PNET⁹, obteniendo también buenos resultados. El adenovirus VCN-01 diseñado

por Alemany *et al.*¹⁶⁶ es un adenovirus de replicación competente y selectiva en células tumorales, que expresa la enzima hialuronidasa PH20, capaz de degradar el ácido hialurónico de la matriz extracelular, mejorando la distribución y potencia viral. Todos los estudios con este virus han dado paso a la apertura de un ensayo clínico donde se evaluará la seguridad y tolerancia del adenovirus VCN-01 en tumores pediátricos raros del SNC, entre los que se encuentra el AT/RT. Este es un claro ejemplo de traslación de nuevos tratamientos del laboratorio a la clínica.

En este trabajo se exponen los primeros pasos para establecer un nuevo tipo de terapia que esperamos, debido a su seguridad y a los buenos resultados preclínicos, pronto se convierta en una herramienta más con la que podamos para tratar a los niños que sufren esta terrible enfermedad.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los AT/RT son tumores permisivos para la infección y la replicación del adenovirus Delta-24-RGD, datos validados en modelos *in vitro* con las líneas celulares BT-12, CHLA-06 y CHLA-266.
2. La replicación del virus Delta-24-RGD produce un efecto citolítico en las líneas de AT/RT de forma dosis dependiente y promueve la liberación de señales de daño celular, DAMPs, las cuales podrían activar los mecanismos de muerte celular inmunogénica *in vivo*.
3. El adenovirus Delta-24-RGD mostró un claro efecto antitumoral en modelos ortotópicos de AT/RT supratentorial e infratentorial en animales inmunodeprimidos, aumentando significativamente la supervivencia y en algunos casos dando lugar a supervivientes de largo tiempo libres de tumor.
4. El sistema *guide-screw* utilizado para la implantación de células BT-12 GFP/luc en el ventrículo lateral derecho de los ratones da lugar a la aparición de enfermedad diseminada.
5. En el modelo diseminado, tras el tratamiento con Delta-24-RGD, se obtiene un aumento significativo de la supervivencia, confirmando su capacidad antitumoral.
6. En el modelo humanizado inmunocompetente, el adenovirus Delta-24-RGD es capaz de replicarse y producir un efecto terapéutico tras la implantación de la línea de AT/RT CHLA-06.
7. El análisis del microambiente tumoral en los ratones inmunocompetentes tras el tratamiento con Delta-24-RGD, induce el reclutamiento de CD8+ y una reducción de la subpoblación CD68+, pudiendo alterar el microambiente tumoral hacia un fenotipo proinflamatorio.
8. El análisis de la infiltración tumoral linfocitaria 15 días post-tratamiento con Delta-24-RGD parece aumentar las poblaciones de linfocitos T, tanto CD4+ como CD8+.

BIBLIOGRAFÍA

1. Jankowski M, Dresse MF, Forget P, Piette C, Florquin B, Hoyoux C. Epidemiology of childhood cancer, a single-center study (1985-2016). *Rev Med Liege*. 2019;74(3):146-151. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30897314/>. Accessed January 15, 2021.
2. Steliarova-Foucher E, Colombet M, Ries LAG, et al. International incidence of childhood cancer, 2001–10: a population-based registry study. *Lancet Oncol*. 2017;18(6):719-731. doi:10.1016/S1470-2045(17)30186-9
3. Ostrom QT, Patil N, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS statistical report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2013-2017. *Neuro Oncol*. 2020;22(Supplement_1):IV1-IV96. doi:10.1093/neuonc/noaa200
4. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. 2016;131(6):803-820. doi:10.1007/s00401-016-1545-1
5. Kristensen BW, Priesterbach-Ackley LP, Petersen JK, Wesseling P. Molecular pathology of tumors of the central nervous system. *Ann Oncol*. 2019;30(8):1265-1278. <http://www.annalsofoncology.org/article/S0923753419312839/fulltext>. Accessed January 28, 2021.
6. Adekunle M Adesina ATY. Pathology of embryonal tumors. *medscape*. 2018.
7. McGovern SL1, Grosshans D MA. Embryonal brain tumors. *Cancer J*. 2014;20(6):397-.
8. Ostrom QT, Gittleman H, Xu J, et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2009-2013. *Neuro Oncol*. 2016;18(July):v1-v75.
9. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007;114(2):97-109.
10. Sin-Chan P, Li BK, Ho B, Fonseca A, Huang A. Molecular Classification and Management of Rare Pediatric Embryonal Brain Tumors. *Curr Oncol Rep*. 2018;20(9):69. doi:10.1007/s11912-018-0717-7
11. Pickles JC, Hawkins C, Pietsch T, Jacques TS. CNS embryonal tumours: WHO

- 2016 and beyond. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2018;44(2):151-162.
12. Ostrom QT, De Blank PM, Kruchko C, et al. Alex's Lemonade stand foundation infant and childhood primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro Oncol.* 2015;16(June):x1-x35.
 13. Weeks DA, Beckwith JB, Mierau GW, Luckey DW. Rhabdoid tumor of kidney. A report of 111 cases from the National Wilms' Tumor Study Pathology Center. *Am J Surg Pathol.* 1989. doi:10.1097/00000478-198906000-00001
 14. Biegel JA, Zhou JY, Rorke LB, Stenstrom C, Wainwright LM, Fogelgren B. Germ-line and acquired mutations of INI1 in atypical teratoid and rhabdoid tumors. *Cancer Res.* 1999;59(1):74-79. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9892189>. Accessed September 20, 2018.
 15. Rorke LB, Packer RJ, Biegel JA. Central nervous system atypical teratoid/rhabdoid tumors of infancy and childhood: Definition of an entity. *J Neurosurg.* 1996;85(1):56-65. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8683283/>. Accessed September 2, 2020.
 16. Ostrom QT, Chen Y, De Blank PM, et al. The descriptive epidemiology of atypical teratoid/rhabdoid tumors in the United States, 2001-2010. *Neuro Oncol.* 2014;16(10):1392-1399.
 17. Hilden JM, Meerbaum S, Burger P, et al. Central nervous system atypical teratoid/rhabdoid tumor: results of therapy in children enrolled in a registry. *J Clin Oncol.* 2004;22(14):2877-2884. <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2004.07.073>. Accessed September 21, 2018.
 18. Frühwald MC, Biegel JA, Bourdeaut F, Roberts CWM, Chi SN. Atypical teratoid/rhabdoid tumors-current concepts, advances in biology, and potential future therapies. *Neuro Oncol.* 2016;18(6):764-778. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26755072>. Accessed September 26, 2018.
 19. Lau CSM, Mahendraraj K, Chamberlain RS. Atypical teratoid rhabdoid tumors: A population-based clinical outcomes study involving 174 patients from the Surveillance, Epidemiology, and End Results database (1973–2010). *Cancer Manag Res.* 2015.

20. Han, Kakkar A, Sarkar C, Julka, PramBiswas A, Kashyap LK. Atypical teratoid/rhabdoid tumors: Challenges and search for solutions. *Cancer Manag Res.* 2016;8:115-125.
21. Buscariollo DL, Park HS, Roberts KB, Yu JB. Survival outcomes in atypical teratoid rhabdoid tumor for patients undergoing radiotherapy in a Surveillance, Epidemiology, and End Results analysis. *Cancer.* 2012;118(17):4212-4219.
22. Athale UH, Duckworth J, Odame I, Barr R. Childhood atypical teratoid rhabdoid tumor of the central nervous system: A meta-analysis of observational studies. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2009;31(9):651-663. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19707161/>. Accessed September 4, 2020.
23. Lafay-Cousin L, Hawkins C, Carret AS, et al. Central nervous system atypical teratoid rhabdoid tumours: The Canadian Paediatric Brain Tumour Consortium experience. *Eur J Cancer.* 2012;48(3):353-359.
24. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-685. doi:10.1038/227680a0
25. Jin B, Feng XY. MRI features of atypical teratoid/rhabdoid tumors in children. *Pediatr Radiol.* 2013;43(8):1001-1008. doi:10.1007/s00247-013-2646-9
26. Judkins AR, Mauger J, Rorke LB, Biegel JA. Immunohistochemical Analysis of hSNF5/INI1 in Pediatric CNS Neoplasms. *Am J Surg Pathol.* 2004;28(5):644-650. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15105654/>. Accessed September 25, 2020.
27. Johann PD, Erkek S, Zapatka M, et al. Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumors Are Comprised of Three Epigenetic Subgroups with Distinct Enhancer Landscapes. *Cancer Cell.* 2016;29(3):379-393.
28. Jackson EM, Sievert AJ, Gai X, et al. Genomic analysis using high-density single nucleotide polymorphism-based oligonucleotide arrays and multiplex ligation-dependent probe amplification provides a comprehensive analysis of INI1/SMARCB1 in malignant rhabdoid tumors. *Clin Cancer Res.* 2009;15(6):1923-1930. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19276269/>. Accessed September 25, 2020.
29. Kohashi K, Oda Y. Oncogenic roles of SMARCB1/INI1 and its deficient tumors.

- Cancer Sci.* 2017;108(4):547-552. <http://doi.wiley.com/10.1111/cas.13173>. Accessed January 27, 2021.
30. Kalimuthu SN, Chetty R. Gene of the month: SMARCB1. *J Clin Pathol.* 2016;69(6):484-489. doi:10.1136/jclinpath-2016-203650
 31. Kim KH, Roberts CWM. Mechanisms by which SMARCB1 loss drives rhabdoid tumor growth. *Cancer Genet.* 2014;207(9):365-372.
 32. Helming KC, Wang X, Roberts CWM. Vulnerabilities of mutant SWI/SNF complexes in cancer. *Cancer Cell.* 2014;26(3):309-317.
 33. Tolstorukov MY, Sansam CG, Lu P, et al. Swi/Snf chromatin remodeling/tumor suppressor complex establishes nucleosome occupancy at target promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(25):10165-10170. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1302209110. Accessed October 19, 2020.
 34. Kadoch C, Hargreaves DC, Hodges C, et al. Proteomic and bioinformatic analysis of mammalian SWI/SNF complexes identifies extensive roles in human malignancy. *Nat Genet.* 2013;45(6):592-601. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23644491/>. Accessed October 9, 2020.
 35. Kaeser MD, Aslanian A, Dong MQ, Yates JR, Emerson BM. BRD7, a novel PBAF-specific SWI/SNF subunit, is required for target gene activation and repression in embryonic stem cells. *J Biol Chem.* 2008;283(47):32254-32263.
 36. Lickert H, Takeuchi JK, Von Both I, et al. Baf60c is essential for function of BAF chromatin remodelling complexes in heart development. *Nature.* 2004;432(7013):107-112. doi:10.1038/nature03071
 37. Hasselblatt M, Isken S, Linge A, et al. High-resolution genomic analysis suggests the absence of recurrent genomic alterations other than SMARCB1 aberrations in atypical teratoid/rhabdoid tumors. *Genes Chromosom Cancer.* 2013;52(2):185-190. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23074045/>. Accessed September 25, 2020.
 38. Wang X, Lee RS, Alver BH, et al. SMARCB1-mediated SWI/SNF complex function is essential for enhancer regulation. *Nat Genet.* 2017;49(2):289-295. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27941797>. Accessed September 26, 2018.
 39. Frühwald MC, Biegel JA, Bourdeaut F, Roberts CWM, Chi SN. Atypical

- teratoid/rhabdoid tumors - Current concepts, advances in biology, and potential future therapies. *Neuro Oncol.* 2016;18(6):764-778. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26755072/>. Accessed September 3, 2020.
40. Richardson EA, Ho B, Huang A. Atypical teratoid rhabdoid tumour: From tumours to therapies. *J Korean Neurosurg Soc.* 2018;61(3):302-311.
41. Kordes U, Gesk S, Frühwald MC, et al. Clinical and molecular features in patients with atypical teratoid rhabdoid tumor or malignant rhabdoid tumor. *Genes, Chromosom Cancer.* 2010;49(2):176-181. <http://doi.wiley.com/10.1002/gcc.20729>. Accessed September 30, 2020.
42. Wilson BG, Roberts CWM. SWI/SNF nucleosome remodellers and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(7):481-492. doi:10.1038/nrc3068
43. Torchia J, Golbourn B, Feng S, Rutka JT, Jabado N, Huang A. Integrated (epi)-Genomic Analyses Identify Subgroup-Specific Therapeutic Targets in CNS Rhabdoid Tumors. *Cancer Cell.* 2016;30:891-908.
44. Holdhof D, Johann PD, Spohn M, et al. Atypical teratoid/rhabdoid tumors (ATRTs) with SMARCA4 mutation are molecularly distinct from SMARCB1-deficient cases. *Acta Neuropathol.* 2020;141(2):291-301. doi:10.1007/s00401-020-02250-7
45. Ho B, Johann PD, Grabovska Y, et al. Molecular subgrouping of Atypical Teratoid / Rhabdoid Tumors (ATRT) – a reinvestigation and current consensus. *Neuro Oncol.* 2019;(December 2019):1-12.
46. Michael CF, Martin H, Karolina N, et al. Age and DNA methylation subgroup as potential independent risk factors for treatment stratification in children with atypical teratoid/rhabdoid tumors. *Neuro Oncol.* 2020;22(7):1006-1017.
47. Hoffman LM, Richardson EA, Ho B, et al. Advancing biology-based therapeutic approaches for atypical teratoid rhabdoid tumors. *Neuro Oncol.* 2020;22(7):944-954. <https://academic.oup.com/neuro-oncology/article/22/7/944/5780091>. Accessed October 6, 2020.
48. Chi SN, Zimmerman MA, Yao X, et al. Intensive multimodality Treatment for children with newly diagnosed CNS atypical teratoid rhabdoid tumor. *J Clin*

- Oncol.* 2009;27(3):385-389.
49. Cohen BH, Geyer JR, Miller DC, et al. Pilot Study of Intensive Chemotherapy With Peripheral Hematopoietic Cell Support for Children Less Than 3 Years of Age With Malignant Brain Tumors, the CCG-99703 Phase I/II Study. A Report From the Children's Oncology Group. *Pediatr Neurol.* 2015;53(1):31-46.
 50. Packer RJ, Biegel JA, Blaney S, et al. *Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumor of the Central Nervous System: Report on Workshop.*; 2002. <https://insights.ovid.com/pubmed?pmid=12142780>. Accessed September 18, 2018.
 51. Crist W, Gehan EA, Ragab AH, et al. The Third Intergroup Rhabdomyosarcoma Study. *J Clin Oncol.* 1995;13(3):610-630. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7884423/>. Accessed September 22, 2020.
 52. Bartelheim K, Nemes K, Seeringer A, et al. Improved 6-year overall survival in AT/RT - results of the registry study Rhabdoid 2007. *Cancer Med.* 2016;5(8):1765-1775. <http://doi.wiley.com/10.1002/cam4.741>. Accessed September 14, 2020.
 53. Modena P, Sardi I, Brenca M, et al. Case report: Long-term survival of an infant syndromic patient affected by atypical teratoid-rhabdoid tumor. *BMC Cancer.* 2013;13(1):100. <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-13-100>. Accessed September 30, 2020.
 54. Fulci G, Chiocca EA. Oncolytic viruses for the therapy of brain tumors and other solid malignancies: a review. *Front Biosci.* 2003;8. doi:10.2741/976
 55. N.Dock G. The influence of complicating diseases upon leukaemia[1] G. N.Dock, "The influence of complicating diseases upon leukaemia,," *Am. J. Med. Sci.*, vol. 127, pp. 563–592, 1904.. *Am J Med Sci.* 1904;127:563-592.
 56. DePace N. Sulla scomparsa di un enorme vegetante del collo dell'utero senza cura chirurgica cancro. *La Ginecol.* 1912;9:82–88.
 57. Kelly E, Russell SJ. History of Oncolytic Viruses: Genesis to Genetic Engineering. 2007. doi:10.1038/mt.sj.6300108
 58. Watanabe D, Goshima F. Oncolytic virotherapy by HSV. In: *Advances in*

- Experimental Medicine and Biology*. Vol 1045. Springer New York LLC; 2018:63-84. doi:10.1007/978-981-10-7230-7_4
59. Liu TC, Galanis E, Kirn D. Clinical trial results with oncolytic virotherapy: A century of promise, a decade of progress. *Nat Clin Pract Oncol*. 2007;4(2):101-117. doi:10.1038/ncponc0736
60. Ring CJA. *Printed in Great Britain Cytolytic Viruses as Potential Anti-Cancer Agents*. Vol 83.; 2002.
61. Sinkovics J, Horvath J. New Developments in the Virus Therapy of Cancer: A Historical Review. *Intervirology*. 1993;36(4):193-214. doi:10.1159/000150339
62. Harrington KJ, Puzanov I, Hecht JR, et al. Clinical development of talimogene laherparepvec (T-VEC): A modified herpes simplex virus type-1-derived oncolytic immunotherapy. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2015;15(12):1389-1403. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26558498/>. Accessed February 1, 2021.
63. Ries S, Korn WM. ONYX-015: Mechanisms of action and clinical potential of a replication-selective adenovirus. *Br J Cancer*. 2002;86(1):5-11. </pmc/articles/PMC2746528/?report=abstract>. Accessed January 16, 2021.
64. Kirn D. Virotherapy for cancer: Current status, hurdles, and future directions. *Cancer Gene Ther*. 2002;9(12):959-960. doi:10.1038/sj.cgt.7700554
65. Fountzilias C, Patel S, Mahalingam D. Review: Oncolytic virotherapy, updates and future directions. *Oncotarget*. 2017;8(60):102617-102639.
66. Breitbach CJ, Burke J, Jonker D, et al. Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans. *Nature*. 2011;477(7362):99-104. doi:10.1038/nature10358
67. Adair RA, Roulstone V, Scott KJ, et al. Cell carriage, delivery, and selective replication of an oncolytic virus in tumor in patients. *Sci Transl Med*. 2012;4(138). doi:10.1126/scitranslmed.3003578
68. Kottke T, Galivo F, Wongthida P, et al. Treg Depletion-enhanced IL-2 Treatment Facilitates Therapy of Established Tumors Using Systemically Delivered Oncolytic Virus. *Mol Ther*. 2008;16(7):1217-1226. doi:10.1038/mt.2008.83

69. Liu BL, Robinson M, Han ZQ, et al. ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties. *Gene Ther.* 2003;10(4):292-303. doi:10.1038/sj.gt.3301885
70. Kiyokawa J, Wakimoto H. Preclinical And Clinical Development Of Oncolytic Adenovirus For The Treatment Of Malignant Glioma. *Oncolytic Virotherapy.* 2019;Volume 8:27-37. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31750274/>. Accessed January 12, 2021.
71. Peters C, Rabkin SD. Designing herpes viruses as oncolytics. *Mol Ther - Oncolytics.* 2015;2:15010. doi:10.1038/mto.2015.10
72. Kaufman HL, Kohlhapp FJ, Zloza A. Oncolytic viruses: A new class of immunotherapy drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2015;14(9):642-662.
73. Lobato IAPGPMAP-NBP y RD. Tratamiento de los gliomas mediante virus oncolíticos: revisión de la literatura. *Neurocirugia.* 2005;16.
74. Fueyo J, Alemany R, Gomez-Manzano C, et al. Preclinical characterization of the antiglioma activity of a tropism-enhanced adenovirus targeted to the retinoblastoma pathway. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(9):652-660. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12734316>. Accessed February 12, 2019.
75. Bernstock JD, Vicario N, Li R, et al. Safety and efficacy of oncolytic HSV-1 G207 inoculated into the cerebellum of mice. *Cancer Gene Ther.* 2020;27(3-4):246-255. doi:10.1038/s41417-019-0091-0
76. Martínez-Vélez N, Garcia-Moure M, Marigil M, et al. The oncolytic virus Delta-24-RGD elicits an antitumor effect in pediatric glioma and DIPG mouse models. *Nat Commun.* 2019;10(1):1-10. doi:10.1038/s41467-019-10043-0
77. Garcia-Moure M, Martinez-Velez N, Gonzalez-Huarriz M, et al. The oncolytic adenovirus VCN-01 promotes anti-tumor effect in primitive neuroectodermal tumor models. *Sci Rep.* 2019;9(1). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31591461/>. Accessed February 7, 2021.
78. Desjardins A, Gromeier M, Herndon JE, et al. Recurrent Glioblastoma Treated with Recombinant Poliovirus. *N Engl J Med.* 2018;379(2):150-161.
79. 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(14):1419-1427.
80. Foreman PM, Friedman GK, Cassady KA, Markert JM. Oncolytic Virotherapy for the Treatment of Malignant Glioma. *Neurotherapeutics*. 2017;14(2):333-344.
 81. Lun X, Ruan Y, Jayanthan A, et al. Double-deleted vaccinia virus in virotherapy for refractory and metastatic pediatric solid tumors. *Mol Oncol*. 2013;7(5):944-954. doi:10.1016/j.molonc.2013.05.004
 82. Studebaker AW, Hutzen BJ, Pierson CR, et al. Oncolytic Herpes Virus rRp450 Shows Efficacy in Orthotopic Xenograft Group 3/4 Medulloblastomas and Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumors. *Mol Ther - Oncolytics*. 2017;6:22-30.
 83. Studebaker AW, Kreofsky CR, Pierson CR, Russell SJ, Galanis E, Raffel C. Treatment of medulloblastoma with a modified measles virus. *Neuro Oncol*. 2010. doi:10.1093/neuonc/noq057
 84. Studebaker AW, Hutzen B, Pierson CR, Russell SJ, Galanis E, Raffel C. Oncolytic measles virus prolongs survival in a murine model of cerebral spinal fluid disseminated medulloblastoma. *Neuro Oncol*. 2012.
 85. Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG. Isolation of a Cytopathogenic Agent from Human Adenoids Undergoing Spontaneous Degeneration in Tissue Culture. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1953;84(3):570-573. doi:10.3181/00379727-84-20714
 86. Han G, Niu H, Zhao S, et al. Identification and typing of respiratory adenoviruses in Guangzhou, Southern China using a rapid and simple method. *Viol Sin*. 2013;28(2):103-108. doi:10.1007/s12250-013-3308-7
 87. Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, et al. Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science (80-)*. 1997;275(5304):1320-1323. doi:10.1126/science.275.5304.1320
 88. Chroboczek J, Bieber F, Jacrot B. The sequence of the genome of adenovirus type 5 and its comparison with the genome of adenovirus type 2. *Virology*. 1992;186(1):280-285. doi:10.1016/0042-6822(92)90082-Z
 89. Stasiak AC, Stehle T. Human adenovirus binding to host cell receptors: a

- structural view. *Med Microbiol Immunol*. 2020;209(3):325-333.
90. Rux JJ, Burnett RM. Adenovirus structure. *Hum Gene Ther*. 2004;15(12):1167-1176. doi:10.1089/hum.2004.15.1167
 91. Russell WC. Adenoviruses: Update on structure and function. *J Gen Virol*. 2009;90(1):1-20. doi:10.1099/vir.0.003087-0
 92. Vellinga J, Van der Heijdt S, Hoeben RC. The adenovirus capsid: Major progress in minor proteins. *J Gen Virol*. 2005;86(6):1581-1588. doi:10.1099/vir.0.80877-0
 93. Davison AJ, Benko M, Harrach B. Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol*. 2003;84(11):2895-2908. doi:10.1099/vir.0.19497-0
 94. Francisco Martínez-Flores,* Fausto Alejandro Jiménez-Orozco *, Villegas-Castrejón*** H. Biología molecular de los vectores adenovirales. *Cir Ciruj*. 2006;74:483-493.
 95. Lutz P, Rosa-Calatrava M, Kedinger C. The product of the adenovirus intermediate gene IX is a transcriptional activator. *J Virol*. 1997;71(7):5102-5109. doi:10.1128/jvi.71.7.5102-5109.1997
 96. Tollefson AE, Ying B, Doronin K, Sidor PD, Wold WSM. Identification of a New Human Adenovirus Protein Encoded by a Novel Late I-Strand Transcription Unit. *J Virol*. 2007;81(23):12918-12926. doi:10.1128/jvi.01531-07
 97. Wu E, Nemerow GR. Virus yoga: The role of flexibility in virus host cell recognition. *Trends Microbiol*. 2004;12(4):162-169.
 98. Leopold PL, Kreitzer G, Miyazawa N, et al. Dynein- and microtubule-mediated translocation of adenovirus serotype 5 occurs after endosomal lysis. *Hum Gene Ther*. 2000;11(1):151-165. doi:10.1089/10430340050016238
 99. Huang TG, Savontaus MJ, Shinozaki K, Sauter B V., Woo SLC. Telomerase-dependent oncolytic adenovirus for cancer treatment. *Gene Ther*. 2003;10(15):1241-1247. doi:10.1038/sj.gt.3301987
 100. Sugimoto T, Bartholomeusz C, Tari AM, Ueno NT. Adenovirus type 5 E1A-induced apoptosis in COX-2-overexpressing breast cancer cells. *Breast Cancer Res*. 2007;9(4). doi:10.1186/bcr1739

101. A phase I study of Onyx-015, an E1B attenuated adenovirus, administered intratumorally to patients with recurrent head and neck cancer - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10741699/>. Accessed January 20, 2021.
102. Barker DD, Berk AJ. Adenovirus proteins from both E1B reading frames are required for transformation of rodent cells by viral infection and DNA transfection. *Virology*. 1987;156(1):107-121. doi:10.1016/0042-6822(87)90441-7
103. 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(1):2-12. doi:10.1038/sj.onc.1203251
104. Dyson N, Harlow E. Adenovirus E1A targets key regulators of cell proliferation. *Cancer Surv*. 1992;12:161-195. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1353412/>. Accessed January 17, 2021.
105. Nevins JR. E2F: A link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science (80-)*. 1992;258(5081):424-429.
106. Ryan Miller C, Buchsbaum DJ, Reynolds PN, et al. Differential susceptibility of primary and established human glioma cells to adenovirus infection: Targeting via the epidermal growth factor receptor achieves fiber receptor-independent gene transfer. *Cancer Res*. 1998;58(24):5738-5748. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9865732/>. Accessed January 17, 2021.
107. Dmitriev I, Krasnykh V, Miller CR, et al. An Adenovirus Vector with Genetically Modified Fibers Demonstrates Expanded Tropism via Utilization of a Coxsackievirus and Adenovirus Receptor-Independent Cell Entry Mechanism. *J Virol*. 1998;72(12):9706-9713. <http://jvi.asm.org/>. Accessed January 26, 2021.
108. 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):120-126.
109. Fueyo J, Gomez-Manzano C, Alemany R, et al. *A Mutant Oncolytic Adenovirus Targeting the Rb Pathway Produces Anti-Glioma Effect in Vivo*. www.nature.com/onc. Accessed October 22, 2018.
110. Dai B, Roife D, Kang Y, et al. Preclinical Evaluation of Sequential Combination

- of Oncolytic Adenovirus Delta-24-RGD and Phosphatidylserine-Targeting Antibody in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther.* 2017;16(4):662-670. doi:10.1158/1535-7163.MCT-16-0526
111. Garcia-Moure M, Martinez-Vélez N, Patiño-García A, Alonso MM. Oncolytic adenoviruses as a therapeutic approach for osteosarcoma: A new hope. *J Bone Oncol.* 2017;9:41-47. doi:10.1016/j.jbo.2016.12.001
 112. Kimball KJ, Preuss MA, Barnes MN, et al. A phase I study of a tropism-modified conditionally replicative adenovirus for recurrent malignant gynecologic diseases. *Clin Cancer Res.* 2010;16(21):5277-5287. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0791
 113. Tejada S, Alonso M, Patiño A, Fueyo J, Gomez-Manzano C, Diez-Valle R. Phase I Trial of DNX-2401 for Diffuse Intrinsic Pontine Glioma Newly Diagnosed in Pediatric Patients. *Neurosurgery.* 2018;83(5):1050-1056.
 114. Lang FF, Conrad C, Gomez-Manzano C, et al. FIRST-IN-HUMAN PHASE I CLINICAL TRIAL OF ONCOLYTIC DELTA-24-RGD (DNX-2401) WITH BIOLOGICAL ENDPOINTS: IMPLICATIONS FOR VIRO-IMMUNOTHERAPY. *Neuro Oncol.* 2014;16(suppl 3):iii39-iii39.
 115. Lang FF, Tran ND, Puduvalli VK, et al. Phase 1b open-label randomized study of the oncolytic adenovirus DNX-2401 administered with or without interferon gamma for recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol.* 2017;35(15_suppl):2002-2002. doi:10.1200/jco.2017.35.15_suppl.2002
 116. 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):1607-1615. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17579575/>. Accessed February 19, 2021.
 117. Alonso MM, Cascallo M, Gomez-Manzano C, et al. ICOVIR-5 shows E2F1 addiction and potent antiglioma effect in vivo. *Cancer Res.* 2007;67(17):8255-8263. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17804740/>. Accessed February 19, 2021.
 118. Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(4):e15.

119. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 2004;5(10). doi:10.1186/gb-2004-5-10-r80
120. Cascallo M, Gros A, Bayo N, Serrano T, Capella G, Alemany R. Deletion of VAI and VAII RNA genes in the design of oncolytic adenoviruses. *Hum Gene Ther.* 2006. doi:10.1089/hum.2006.17.929
121. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
122. Abengozar-Muela M, Esparza MV, Garcia-Ros D, et al. Diverse immune environments in human lung tuberculosis granulomas assessed by quantitative multiplexed immunofluorescence. *Mod Pathol.* June 2020. doi:10.1038/s41379-020-0600-6
123. Martinez-Valbuena I, Valenti-Azcarate R, Amat-Villegas I, et al. Amylin as a potential link between type 2 diabetes and alzheimer disease. *Ann Neurol.* 2019;86(4):539-551. doi:10.1002/ana.25570
124. Lal S, Lacroix M, Tofilon P, Fuller GN, Sawaya R, Lang FF. An implantable guide-screw system for brain tumor studies in small animals. *J Neurosurg.* 2000;92(2):326-333. doi:10.3171/jns.2000.92.2.0326
125. Iranzo J, Martincorena I, Koonin E V. Cancer-mutation network and the number and specificity of driver mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(26):E6010-E6019. doi:10.1073/pnas.1803155115
126. Coyne CB, Bergelson JM. CAR: A virus receptor within the tight junction. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57(6):869-882. doi:10.1016/j.addr.2005.01.007
127. Polager S, Ginsberg D. E2F - at the crossroads of life and death. *Trends Cell Biol.* 2008;18(11):528-535. doi:10.1016/j.tcb.2008.08.003
128. Giacinti C, Giordano A. RB and cell cycle progression. *Oncogene.* 2006;25(38):5220-5227. doi:10.1038/sj.onc.1209615
129. Knudsen ES, Wang JYJ. Targeting the RB-pathway in cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2010;16(4):1094-1099. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0787

130. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(1):59-73. doi:10.1038/nri2216
131. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med*. 2007;13(1):54-61.
132. Studebaker AW, Hutzen B, Pierson CR, Shaffer TA, Raffel C, Jackson EM. Oncolytic measles virus efficacy in murine xenograft models of atypical teratoid rhabdoid tumors. *Neuro Oncol*. 2015;17(12):1568-1577. <https://academic.oup.com/neuro-oncology/article-lookup/doi/10.1093/neuonc/nov058>. Accessed November 5, 2018.
133. Jiang H, Clise-Dwyer K, Ruisaard KE, et al. Delta-24-RGD oncolytic adenovirus elicits anti-glioma immunity in an immunocompetent mouse model. *PLoS One*. 2014;9(5). doi:10.1371/journal.pone.0097407
134. Billerbeck E, Barry WT, Mu K, Dorner M, Rice CM, Ploss A. Development of human CD4+FoxP3+ regulatory T cells in human stem cell factor-, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-, and interleukin-3-expressing NOD-SCID IL2R γ null humanized mice. *Blood*. 2011;117(11):3076-3086. doi:10.1182/blood-2010-08-301507
135. *Onco-HuTM Models: Humanized NSGTM and NSGTM-SGM3 Mice for Immunology*.
136. Ostrom QT, Cioffi G, Gittleman H, 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-v100. https://academic.oup.com/neuro-oncology/article/21/Supplement_5/v1/5610892. Accessed January 14, 2021.
137. Hammill AM, Conner J, Cripe TP. Oncolytic virotherapy reaches adolescence. *Pediatr Blood Cancer*. 2010;55(7):1253-1263. doi:10.1002/pbc.22724
138. Nemunaitis J, Cunningham C, Buchanan A, et al. Intravenous infusion of a replication-selective adenovirus (ONYX-015) in cancer patients: Safety, feasibility and biological activity. *Gene Ther*. 2001;8(10):746-759.

139. Garcia-Moure M, Gonzalez-Huarriz M, Labiano S, et al. Delta-24-RGD, an oncolytic adenovirus, increases survival and promotes proinflammatory immune landscape remodeling in models of AT/RT and CNS-PNET. *Clin Cancer Res*. December 2020;clincanres.3313.2020. doi:10.1158/1078-0432.ccr-20-3313
140. Sturm D, Orr BA, Toprak UH, et al. New Brain Tumor Entities Emerge from Molecular Classification of CNS-PNETs. *Cell*. 2016;164(5):1060-1072. doi:10.1016/j.cell.2016.01.015
141. Yu JC, Khodadadi H, Malik A, et al. Innate Immunity of Neonates and Infants. *Front Immunol*. 2018;9:1759. doi:10.3389/fimmu.2018.01759
142. Simon AK, Hollander GA, McMichael A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proc R Soc B Biol Sci*. 2015;282(1821).
143. Athale UH, Duckworth J, Odame I, Barr R. Childhood atypical teratoid rhabdoid tumor of the central nervous system: A meta-analysis of observational studies. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2009;31(9):651-663. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19707161/>. Accessed September 8, 2020.
144. Ram Z, Culver KW, Walbridge S, Frank JA, Blaese RM, Oldfield EH. Toxicity studies of retroviral-mediated gene transfer for the treatment of brain tumors. *J Neurosurg*. 1993;79(3):400-407. doi:10.3171/jns.1993.79.3.0400
145. Lieber A, He CY, Meuse L, et al. The role of Kupffer cell activation and viral gene expression in early liver toxicity after infusion of recombinant adenovirus vectors. *J Virol*. 1997;71(11).
146. Hsich G, Sena-Esteves M, Breakefield XO. Critical issues in gene therapy for neurologic disease. *Hum Gene Ther*. 2002;13(5):579-604. doi:10.1089/10430340252837198
147. Srinivasan VM, Gumin J, Camstra KM, et al. Endovascular selective intra-arterial infusion of mesenchymal stem cells loaded with Delta-24 in a canine model. *Neurosurgery*. 2021;88(1):E102-E113. doi:10.1093/neuros/nyaa470
148. Yong RL, Shinojima N, Fueyo J, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells for intravascular delivery of oncolytic adenovirus Δ 24-RGD to human gliomas. *Cancer Res*. 2009;69(23):8932-8940. doi:10.1158/0008-

- 5472.CAN-08-3873
149. García-Castro J, Alemany R, Ramírez M, et al. Experiencia clínica con una nueva terapia oncolítica antimetastásica. *An Pediatría*. 2007;66(3):337-338.
 150. Mato-Berciano A, Morgado S, Maliandi M V., et al. Oncolytic adenovirus with hyaluronidase activity that evades neutralizing antibodies: VCN-11. *J Control Release*. March 2021. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365921001103>. Accessed March 15, 2021.
 151. Ng JMY, Martinez D, Marsh ED, et al. Generation of a Mouse Model of Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumor of the Central Nervous System through Combined Deletion of Snf5 and p53. *Cancer Res*. 2015;75(21):4629-4639.
 152. Han Z-Y, Richer W, Fréneaux P, et al. The occurrence of intracranial rhabdoid tumours in mice depends on temporal control of Smarcb1 inactivation. *Nat Commun*. 2016;7(1):10421. doi:10.1038/ncomms10421
 153. Leruste A, Tosello J, Ramos RN, et al. Clonally Expanded T Cells Reveal Immunogenicity of Rhabdoid Tumors. *Cancer Cell*. 2019;36(6):597-612.
 154. Brehm MA, Bortell R, DiIorio P, et al. Human immune system development and rejection of human islet allografts in spontaneously diabetic NOD-Rag1null IL2rynull Ins2Akita mice. *Diabetes*. 2010;59(9):2265-2270.
 155. Waldron-Lynch F, Deng S, Preston-Hurlburt P, Henegariu O, Herold KC. Analysis of human biologics with a mouse skin transplant model in humanized mice. *Am J Transplant*. 2012;12(10):2652-2662. doi:10.1111/j.1600-6143.2012.04178.x
 156. Wang M, Yao L, Cheng M, et al. Humanized mice in studying efficacy and mechanisms of PD-1-targeted cancer immunotherapy. *FASEB J*. 2018;32(3):1537-1549. doi:10.1096/fj.201700740R
 157. Blair GE, Dixon SC, Griffiths SA, Blair Zajdel ME. Restricted replication of human adenovirus type 5 in mouse cell lines. *Virus Res*. 1989;14(4):339-346.

158. Koohy H, Bolland DJ, Matheson LS, et al. Genome organization and chromatin analysis identify transcriptional downregulation of insulin-like growth factor signaling as a hallmark of aging in developing B cells. *Genome Biol.* 2018;19(1).
159. Chen Z, Ross JL, Hambarzumyan D. Intravital 2-photon imaging reveals distinct morphology and infiltrative properties of glioblastoma-associated macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(28):14254-14259.
160. Hambarzumyan D, Gutmann DH, Kettenmann H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nat Neurosci.* 2015;19(1):20-27. doi:10.1038/nn.4185
161. Maximov V, Chen Z, Wei Y, et al. Tumour-associated macrophages exhibit anti-tumoural properties in Sonic Hedgehog medulloblastoma. *Nat Commun.* 2019;10(1):1-11. doi:10.1038/s41467-019-10458-9
162. Melcher V, Graf M, Interlandi M, et al. Macrophage-tumor cell interaction promotes ATRT progression and chemoresistance. *Acta Neuropathol.* 2020;139(5):913-936. doi:10.1007/s00401-019-02116-7
163. Zhang Q wen, Liu L, Gong C yang, et al. Prognostic Significance of Tumor-Associated Macrophages in Solid Tumor: A Meta-Analysis of the Literature. *PLoS One.* 2012;7(12). doi:10.1371/journal.pone.0050946
164. Strojnik T, Kavalar R, Zajc I, Diamandis EP, Oikonomopoulou K, Lah TT. Prognostic impact of CD68 and kallikrein 6 in human glioma. *Anticancer Res.* 2009;29(8):3269-3279. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19661345/>. Accessed March 3, 2021.
165. Vera B, Martínez-Vélez N, Xipell E, et al. Characterization of the antiglioma effect of the oncolytic adenovirus VCN-01. *PLoS One.* 2016;11(1).
166. 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):1275-1283.

ANEXO



Delta-24-RGD, an Oncolytic Adenovirus, Increases Survival and Promotes Proinflammatory Immune Landscape Remodeling in Models of AT/RT and CNS-PNET

Marc Garcia-Moure^{1,2,3}, Marisol Gonzalez-Huarriz^{1,2,3}, Sara Labiano^{1,2,3}, Elizabeth Guruceaga^{1,4}, Eva Bandres^{1,5}, Marta Zalacain^{1,2,3}, Lucia Marrodan^{1,2,3}, Carlos de Andrea^{1,6}, Maria Villalba^{1,6,7}, Naiara Martinez-Velez^{1,2,3}, Virginia Laspidea^{1,2,3}, Montse Puigdelloses^{1,2,8}, Jaime Gallego Perez-Larraya^{1,2,8}, Ignacio Iñigo-Marco^{1,2,5}, Renata Stripecke⁹, Jennifer A. Chan¹⁰, Eric H. Raabe^{11,12}, Marcel Kool^{13,14,15}, Candelaria Gomez-Manzano^{16,17}, Juan Fueyo^{17,18}, Ana Patiño-García^{1,2,3}, and Marta M. Alonso^{1,2,3}

ABSTRACT

Purpose: Atypical teratoid/rhabdoid tumors (AT/RT) and central nervous system primitive neuroectodermal tumors (CNS-PNET) are pediatric brain tumors with poor survival and life-long negative side effects. Here, the aim was to characterize the efficacy and safety of the oncolytic adenovirus, Delta-24-RGD, which selectively replicates in and kills tumor cells.

Experimental Design: Delta-24-RGD determinants for infection and replication were evaluated in patient expression datasets. Viral replication and cytotoxicity were assessed *in vitro* in a battery of CNS-PNET and AT/RT cell lines. *In vivo*, efficacy was determined in different orthotopic mouse models, including early and established tumor models, a disseminated AT/RT lesion model, and immunocompetent humanized mouse models (hCD34⁺-NSG-SGM3).

Results: Delta-24-RGD infected and replicated efficiently in all the cell lines tested. In addition, the virus induced dose-dependent

cytotoxicity [IC₅₀ value below 1 plaque-forming unit (PFU)/cell] and the release of immunogenic markers. *In vivo*, a single intratumoral Delta-24-RGD injection (10⁷ or 10⁸ PFU) significantly increased survival and led to long-term survival in AT/RT and PNET models. Delta-24-RGD hindered the dissemination of AT/RTs and increased survival, leading to 70% of long-term survivors. Of relevance, viral administration to established tumor masses (30 days after engraftment) showed therapeutic benefit. In humanized immunocompetent models, Delta-24-RGD significantly extended the survival of mice bearing AT/RTs or PNETs (ranging from 11 to 27 days) and did not display any toxicity associated with inflammation. Immunophenotyping of Delta-24-RGD-treated tumors revealed increased CD8⁺ T-cell infiltration.

Conclusions: Delta-24-RGD is a feasible therapeutic option for AT/RTs and CNS-PNETs. This work constitutes the basis for potential translation to the clinical setting.

Introduction

Brain tumors are the solid tumors most frequently affecting children under 15 years old and have a devastating impact on childhood mortality, as they contribute to nearly 30% of all cancer-related deaths in children (1). By histologic grouping, embryonal tumors comprise up

to 24.9% of central nervous system (CNS) malignancies in infants under 1 year old, as well as 20.2% of those in children 1–4 years old (2). Embryonal CNS tumors include a heterogeneous group of highly cellular and mitotically active immature-appearing neoplasms that are able to invade surrounding tissues and disseminate through the cerebrospinal fluid (3, 4). Among these embryonal CNS tumors, in

¹Health Research Institute of Navarra (IdiSNA), Pamplona, Navarra, Spain. ²Program in Solid Tumors, Foundation for the Applied Medical Research, Pamplona, Navarra, Spain. ³Department of Pediatrics, Clínica Universidad de Navarra, Pamplona, Navarra, Spain. ⁴Bioinformatics Platform, Center for Applied Medical Research (CIMA), University of Navarra, Pamplona, Navarra, Spain. ⁵Immunology Unit, Department of Hematology, Complejo Hospitalario de Navarra, Pamplona, Navarra, Spain. ⁶Department of Pathology, Clínica Universidad de Navarra, Pamplona, Navarra, Spain. ⁷Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), Madrid, Spain. ⁸Department of Neurology, Clínica Universidad de Navarra, Pamplona, Navarra, Spain. ⁹Department of Hematology, Hemostasis, Oncology and Stem Cell Transplantation, Laboratory of Regenerative Immune Therapies Applied of the Research Network REBIRTH, German Centre for Infection Research (DZIF), partner site Hannover, Hannover, Germany. ¹⁰Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada. ¹¹Department of Pathology, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland. ¹²Division of Pediatric Oncology, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland. ¹³Division of Pediatric Neurooncology, German Cancer Research Center (DKFZ) and German Cancer Consortium (DKTK), Heidelberg,

Germany. ¹⁴Hopp Children's Cancer Center (KITZ), Heidelberg, Germany. ¹⁵Princess Máxima Center for Pediatric Oncology, Utrecht, the Netherlands. ¹⁶Department of NeuroOncology, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas. ¹⁷Department of Genetics, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas. ¹⁸Department of Neurosurgery, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas.

Note: Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

M. Garcia-Moure and M. Gonzalez-Huarriz contributed equally to this article.

Corresponding Authors: Marta M. Alonso, University Hospital of Navarra, University of Navarra, Av. Pio XII, 55, Cima Building, Pamplona, Navarra 31008, Spain. Phone: 34948-19470-02026; Fax: 349-4819-4717; E-mail: mmalonso@unav.es; and Marc Garcia-Moure, E-mail: mgmour@unav.es

Clin Cancer Res 2021;XX:XX-XX

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-3313

©2020 American Association for Cancer Research.

Translational Relevance

Atypical teratoid/rhabdoid tumors (AT/RT) and central nervous system primitive neuroectodermal tumors (CNS-PNET) are pediatric brain tumors with few therapeutic options at recurrence and a poor survival rate. Moreover, patients who survive face severe side effects that hinder their quality of life. Advancements in the treatment of these rare tumors have been hampered by the paucity of translational studies in relevant pediatric models that support their translation to clinical studies. Delta-24-RGD is an oncolytic adenovirus that has been shown to be safe and efficacious in adult brain tumors, offering a rationale for assessing its potential for childhood brain cancer treatment. In this study, we provide comprehensive evidence of the safety and efficacy of the Delta-24-RGD in animal models that recapitulate relevant challenging clinical problems of AT/RTs and CNS-PNETs, underscoring the therapeutic potential of this virus. Our data provide a strong foundation for initiating a clinical trial implementing Delta-24-RGD for the treatment of these pediatric brain tumors.

this study, atypical teratoid/rhabdoid tumors (AT/RT) and CNS primitive neuroectodermal tumors (CNS-PNET), two aggressive brain tumors that comprise nearly 30% of embryonal tumors in children, were the focus (1).

AT/RTs are highly malignant brain tumors that are characterized by biallelic loss of function of SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily b-member 1 (SMARCB1) or, more rarely, SMARCA4 (5–7). AT/RT peak incidence occurs during the first 2 years of life and represents the most common type of malignant CNS tumor in children under 1 year old (2, 8, 9). Despite intensive multimodal therapies, most patients with AT/RT inevitably experience recurrence, with a median survival time of 6–11 months (10, 11). Unlike AT/RTs, CNS-PNETs represent a group of heterogeneous diseases, as revealed by molecular profiling. While researchers are still exploring molecular markers to precisely classify these tumors, the World Health Organization has reclassified tumors that were defined previously as CNS-PNETs into a new group known as CNS embryonal tumors, not otherwise specified (12). Currently, most PNETs are treated with multimodal therapeutic protocols designed for high-risk medulloblastomas (13, 14), which induce serious side effects in these patients. The prognosis of patients affected by these embryonal tumors remains dismal; therefore, it is essential to further explore novel therapeutic approaches to improve the life expectancy and quality of life of these children.

Oncolytic virotherapy is a promising therapeutic strategy based on the administration of cancer-selective viruses (15). Delta-24-RGD is a conditionally replicative adenovirus that contains two modifications that endow it with tumor specificity (16, 17). Delta-24-RGD has shown promising therapeutic results in preclinical studies (17–20), leading to clinical trials for the treatment of ovarian cancer (21) and recurrent high-grade gliomas (NCT00805376 and NCT01956734; ref. 22). Previous results have revealed that intratumoral injection of Delta-24-RGD induces an initial phase of oncolysis, followed by a delayed inflammatory response with a reduction in the tumor burden (21, 23). Importantly, an ongoing clinical trial employing Delta-24-RGD as a therapeutic agent in children affected by diffuse intrinsic pontine gliomas (NCT03178032;

refs. 24, 25) has shown no signs of toxicity, thus underscoring the feasibility of Delta-24-RGD for the treatment of pediatric brain tumors.

In this study, we explored the use of the oncolytic adenovirus, Delta-24-RGD, as a therapeutic agent in preclinical models of AT/RTs and CNS-PNETs *in vitro* and *in vivo*. We found that Delta-24-RGD replicated in and induced immunogenic cell death marker expression in AT/RT and PNET cultures *in vitro*. Furthermore, *in vivo*, Delta-24-RGD treatment resulted in extended overall survival in several murine models of these diseases. Moreover, Delta-24-RGD treatment exerted significant antitumor effects on a metastatic model of AT/RTs. Delta-24-RGD treatment of immunocompetent humanized mouse models bearing AT/RTs or PNETs also led to an increase in overall survival and triggered antitumor immune responses that involved tumor immune microenvironment remodeling. Taken together, these results underscore the therapeutic potential of Delta-24-RGD for treatment of local and metastatic AT/RTs and PNETs and provide a foundation for the use of Delta-24-RGD in future clinical trials targeting these embryonal tumors.

Materials and Methods

Bioinformatic analyses

The public datasets used for this analysis were downloaded from the Gene Expression Omnibus data repository (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>; RRID:SCR_005012). For PNET and normal brain samples, the normalized data matrix for GSE14295 experiments was downloaded. Raw data for AT/RT samples (GSE70678) were also downloaded and normalized using RMA (26). First, a filtering process was performed in R/Bioconductor (27). Genes with expression levels lower than the noise signal in more than 50% of the samples of all the studied conditions (fetal brains, adult brains, PNETs, and AT/RTs) were considered to be not expressed. Then, the relative expression abundance was calculated for each gene by gene expression standardization with a mean of 0 and a SD of 1.

Infectivity assays

A total of 2×10^5 cells (6-well plates) were infected with Delta-24-RGD/GFP at a multiplicity of infections (MOI) of 0, 0.1, 1, 10, or 100 plaque-forming units (PFU)/cell. At 48-hour postinfection, transduction was verified by fluorescence microscopy, after which samples were harvested and washed with PBS. Then, the percentage of GFP⁺ cells was determined by flow cytometry (FACSCantoII) and analyzed with FlowJo V10 (BD Biosciences, RRID:SCR_008520).

Activity of the transcription factor E2F-1

A total of 3×10^5 cells (24-well plates) were transfected (Fugene 6; E2691; Promega) with 250 ng of plasmid, E2F-1-Luc, expressing a firefly luciferase reporter under the control of an E2F-1-responsive promoter (28). In addition, 250 ng of pRL-cytomegalovirus (CMV), which constitutively expresses *Renilla* luciferase (E2261; Promega), was cotransfected as a transfection control. Twenty-four hours later, firefly and *Renilla* luciferase activities were measured using a Dual-Luciferase Reporter Assay System according to the manufacturer's instructions (E1910; Promega).

Viral proteins

A total of 2×10^5 PNET or AT/RT cells (6-well plates) were infected with Delta-24-RGD at an MOI of 0, 5, 10, 25, or 50 PFUs/cell. At 16 hours postinfection, the cultures were washed with PBS, and fresh growth medium was added. At 48 hours postinfection, the cells were

harvested and washed with PBS. Proteins were extracted with PBS 0.1% SDS, and protein concentrations were measured with Protein Assay Dye Reagent (Bio-Rad Laboratories, RRID:SCR_008426). Then, the presence of viral proteins (E1A and fiber) was detected by Western blotting (see the Supplementary Materials and Methods for the detailed protocol).

Viral replication assays

Cell cultures (10^5 cells/well; 6-well plates) were infected with 10 PFUs/cell of Delta-24-RGD. After 72 hours, complete cell cultures were collected and freeze-thawed three times, and total infectious titers were determined by serial dilutions in HEK293 cells by hexon staining (29).

Cell viability assays

Adherent cell lines were established as follows. We performed 3-day and 5-day kinetic studies to establish the most appropriate number of cells per 96-well plate, which were as follows: BT-12, HB, and PFSK-1: 2,000 cells; CHLA-266: 6,000 cells; and CHLA-06: 15,000 cells. Then, cultures were infected with Delta-24-RGD at different MOIs ranging from 0 to 50. Cell viability was measured 3 and 5 days later using the CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (G3581, Promega), as described previously (30).

Suspension cell lines were established as follows. Both JHU-CTX-GBMP1 (CTX) and BT-183 cells grown in suspension were plated at a density of 2×10^5 cells per well in 6-well plates. At 3 and 5 days after infection with the same doses as above, cells were stained with trypan blue to enable cell counting. Dose-response curves were analyzed using GraphPad Prism 8 (Statistical Software for Sciences, RRID: SCR_002798) to determine the IC_{50} value of Delta-24-RGD in these cells.

Measurement of damage-associated molecular patterns

Each cell line was plated at a density of 2×10^5 cells per well (6-well plates) and infected with Delta-24-RGD at the corresponding 3-day IC_{50} value. Seventy-two hours later, the concentrations of the damage-associated molecular pattern (DAMP) markers Hsp90 α (ADI-EKS-895, Enzo Life Sciences Inc.), HMGB1 (ST51011, IBL International), and ATP (ENLITEN ATP Assay System, FF2000, Promega) were measured in supernatants of infected and mock-infected cultures.

Calreticulin (CRT) translocation to the plasma membrane was determined by immunofluorescence staining of 2×10^4 cells infected with Delta-24-RGD at a dose corresponding to the 3-day IC_{50} value (or PBS as a negative control). At 4 hours postinfection, cells were fixed in 4% methanol-free formaldehyde (28906, Thermo Fisher Scientific) for 15 minutes at 37°C and then stained with appropriate antibodies. The extended immunofluorescence protocol is included in the Supplementary Materials and Methods.

Animal procedures and *in vivo* tumor models

In vivo experiments with PFSK-1 and JHU-HB-GBMP1 tumor xenograft models were carried out in 4- to 6-week-old female athymic nude (nu/nu) mice (Envigo). Studies of BT-183, BT-12, CHLA-06, and CHLA-266 xenograft models were performed in 4- to 6-week-old Balb/c-Rag2tFwa-Il2rg mice. In addition, hCD34-humanized mice (hu-CD34-NSG-SGM3, The Jackson Laboratory) were used to develop supratentorial PFSK-1 (10^5 cells) and CHLA-06 (2×10^6 cells) tumors in an immunocompetent environment.

Tumor cells and treatments were injected following the guide-screw system described by Lal and colleagues (31). For the orthotopic

supratentorial model, CHLA-266 (2×10^6), PFSK-1 (10^5), or JHU-HB-GBMP1 (10^6) cells were injected into the striatum at the following coordinates with respect to the bregma: 2.5 mm lateral, 1 mm cranial, and 2 mm deep (3.5 mm including screw height). The infratentorial xenograft model was established by injecting 5×10^5 tumor cells (BT-12, CHLA-06, or CHLA-266) into the cerebellum: 1 mm lateral, 0.8 mm posterior, and 2 mm deep (3.5 mm including screw height), with respect to lambda. The disseminated model that we used was based on the intraventricular administration procedure described by Stuebaker and colleagues (32). For this model, BT-12-GFP/luc (10^6) cells were injected into the right lateral ventricle at 1 mm lateral, 0.5 mm posterior, and 3.2 mm deep with respect to the bregma. Mice were screened via bioimaging prior to being treated and were withdrawn in cases in which no reporter signal was detected at the ventricle.

Intratumoral treatments were carried out by injecting 3 μ L of PBS or Delta-24-RGD following the same guide-screw system at the coordinates of the corresponding tumor model. In survival experiments, mice were euthanized when symptoms of disease (e.g., loss of weight and hunched position) were evident. A summary of the *in vivo* experiments performed is described in Supplementary Table S1.

Ethical approval for all animal studies was granted by the Animal Ethical Committee of the University of Navarra (CEEA, Pamplona, Navarra, Spain) under the protocols CEEA/091-18, CEEA/094-15, and CEEA/066-18. All animal studies were performed at the veterinary facilities of the Center for Applied Medical Research (Pamplona, Navarra, Spain) in accordance with institutional, regional, and national laws and ethical guidelines for experimental animal care.

Histologic staining

Formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) brain sections (4 μ m thick) were stained by the hematoxylin and eosin (H&E) method or were immunostained as follows: anti-hexon (1:2,000, AB1056, Merck Millipore), anti-E1A (1:1,000, sc-430, Santa Cruz Biotechnology), anti-CD3 (1:300, RM9107, Thermo Fisher Scientific), anti-Iba-1 (1:4,000, 019-19741, Wako), and anti-GFP (1:1,000, ab6556, Abcam). Signals were developed with Vectastain ABC Kits (Vector Laboratories Inc.) according to the manufacturer's instructions.

Multiplexed immunofluorescence

A multiplex immunolabeling protocol based on tyramide signal amplification and Opal fluorophores was developed and validated essentially as described previously (33). Single-plex chromogenic IHC assays were used as the gold standard for cell antigen visualization and compared against the corresponding fluorescence channel for multiplexed immunofluorescence on sequential FFPE sections. An extended explanation is included in the Supplementary Materials and Methods.

Tissue imaging, spectral unmixing, and phenotyping

Multiplexed immunofluorescence slides were scanned on a Vectra-Polaris Automated Quantitative Pathology Imaging System (Akoya Biosciences), as described previously (33, 34). An extended explanation is included in the Supplementary Materials and Methods.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8 (Statistical Software for Sciences). Dose-response curves for infectivity and viability were obtained by nonlinear regression. For quantitative variables, data with normal distributions were assessed by Shapiro-Wilk tests, and then comparisons among groups were performed using two-tailed (one-tailed when indicated) nonparametric tests with 95%

confidence intervals (CI) for datasets that were nonnormally distributed (Mann–Whitney or Kruskal–Wallis tests) or parametric tests when normality was confirmed (Student *t* test or one/two-way ANOVA). Dunn (nonparametric) or Dunnett/Tukey (one- and two-way ANOVA, respectively) corrections were applied for *post hoc* pairwise comparisons. Kaplan–Meier plots were analyzed by log-rank (Mantel–Cox) tests.

Results

AT/RT and PNET cultures are permissive to Delta-24-RGD infection *in vitro*

Because infection by Delta-24-RGD is mediated by integrins and coxsackie and adenovirus receptor (CAR; refs. 16, 35, 36), we first assessed the relative expression levels of α_v integrin (ITGAV), β_3 integrin (ITGB3), β_5 integrin (ITGB5), and CAR (CXADR) *in silico* in AT/RT and PNET samples, as well as in normal fetal and adult brain samples (Fig. 1A). The expression levels of α_v integrins and CAR were observed in both AT/RT and PNET samples, and their relative abundances were above the mean expression of their respective transcriptomes. In contrast, normal fetal brain samples showed lower relative mRNA expression of α_v integrin. In terms of the β_3 integrin and β_5 integrin genes, their relative abundances in PNET samples were similar to those in normal brain samples and were lower than those in AT/RT samples. We obtained similar results when we performed analyses that accounted for the different molecular subgroups of AT/RTs (Supplementary Fig. S1A). Collectively, these *in silico* findings revealed that AT/RTs and PNETs express receptors for Delta-24-RGD. Confirming the potential susceptibilities of AT/RTs and PNETs to Delta-24-RGD infection, AT/RT and PNET cell lines displayed robust CAR and integrin β_5 expression levels (Fig. 1B). In accordance with the gene expression of β_3 integrin in tumor samples, this receptor was nearly absent in the four cell lines evaluated. Finally, to determine whether the expression of these viral receptors enables endocytosis of the oncolytic virus, Delta-24-RGD, AT/RT and PNET cell lines were infected with Delta-24-RGD expressing the reporter GFP at increasing MOIs ranging from 0.1 to 100 PFUs/cell. We observed dose-dependent expression of GFP in AT/RT and PNET cultures (Fig. 1C). More than 80% of AT/RT and PNET cells were infected at an MOI of 1, and virtually 100% infection was achieved with an MOI of 10 (Fig. 1D). In fact, cells infected at an MOI of 100 were already detached and dying at 48 hours (Fig. 1C). The MOI needed to yield a 50% infection rate was below 0.1 PFUs/cell for BT-12 and CHLA-06 cells, 0.18 PFUs/cell for CHLA-266 cells, and 0.23 PFUs/cells for PFSK-1 cells (Fig. 1D).

Because the heterogeneity and scarcity of CNS-PNET models are major drawbacks for conducting preclinical studies, we next studied the oncolytic effects of Delta-24-RGD on other “PNET-like” tumors to cover a broader range of embryonal tumors, excluding medulloblastomas. Therefore, we assessed the expression levels of viral receptors in the BT-183 cell line, which was derived from an embryonal tumor with multilayered rosettes (ETMR; ref. 37), and the CTX and JHU-HB-GBMP1 (HB) cell lines, which correspond to models of glioblastomas (GBM) with PNET-like components (i.e., currently known as GBMs with primitive neuronal components). CAR expression was detected in the ETMR cell line, BT-183 (Supplementary Fig. S1B), as well as in GBM-PNET-like cultures (Supplementary Fig. S1B). Similar to our results for AT/RT and PNET cultures, the expression levels of $\alpha_v\beta_3$ integrin in ETMR cells and GBM-PNET-like cells were negligible, while $\alpha_v\beta_5$ integrin was detected in the three cell lines tested. Overall, the expression of adenoviral receptors was lower in these models, which is in agreement with their higher resistance to adenoviral

infection (Supplementary Fig. S1C). According to these data, we concluded that AT/RT and PNET cell lines could be readily infected by Delta-24-RGD.

Delta-24-RGD replicates in and exerts antitumor activity in AT/RT and PNET cultures *in vitro*

Delta-24-RGD replication in tumor cells requires a constitutively active E2F pathway. Compared with those in normal human adult and fetal brain samples, the relative E2F-1 levels in PNET and AT/RT samples were higher, indicating that these tumor cells may be permissive to Delta-24-RGD replication (Fig. 2A). The expression levels of other positive cell-cycle regulators, such as *CCND1* and *CDK4/6*, were enriched in different AT/RT molecular subgroups (Supplementary Fig. S2A). In addition, AT/RT cell lines displayed deletion of the tumor suppressor gene, *SMARCB1* (Supplementary Table S2), and the PFSK-1 cell line harbored p53 mutations; both aberrations resulted in cell-cycle deregulation. Regarding direct alterations in the pRb-E2F pathway, only BT-12 cells showed loss of the *CDKN2A* and *CDKN2B* genes encoding the CDK4/6 inhibitors, p16^{INK4a} and p15^{INK4b}, respectively. Corroborating this finding, we found a significant increase in E2F-1 promoter activity in PNET and AT/RT cell lines compared with normal astrocytes (Fig. 2B). This result demonstrates that although the pRb-E2F pathway is not directly affected at the genomic level in some tumors, other epigenetic mechanisms may upregulate E2F-1 activation, thus suggesting that these tumor cells are potential targets for Delta-24-RGD replication.

We next assessed viral cycle progression in AT/RT and PNET cultures. The E1A protein, which is an adenoviral protein that is transcribed immediately after infection, was detected in all infected AT/RT and PNET cultures at 16 and 48 hours after infection (Supplementary Fig. S2B). Similarly, fiber, a protein that is expressed after viral genome replication, was detected at 48 hours, but not at 16 hours, after infection (Supplementary Fig. S2B). The viral titers in all infected AT/RT and PNET cultures were significantly increased at 72 hours after infection (Fig. 2C; Supplementary Fig. S2C). These results confirm that Delta-24-RGD undergoes a replicative cycle in AT/RT, PNET, and PNET-like cells, although the viral burst size is dependent on the specific cellular model.

Next, we assessed the antitumor effects of Delta-24-RGD on these *in vitro* models (Fig. 2D; Supplementary Fig. S2D). Dose-dependent cytolysis was observed at 3 days after infection in all cultures, which was in agreement with the generation of infectious viral particles observed at 72 hours after infection. At 5 days postinfection, the initial dose required to reach cell death in 50% of a culture dropped dramatically to 1 PFU/cell or less due to the increase in infection/replication/cytolysis rounds.

In addition to its cytolytic activity, Delta-24-RGD also promotes a proinflammatory environment at tumor sites by boosting antitumor immune responses (20, 22). One of the mechanisms that participates in the enhancement of immune responses is the secretion of DAMPs into the extracellular medium by infected tumor cells. We observed significant increases in levels of secreted DAMPs, Hsp90 α and HMGB1, following Delta-24-RGD infection in comparison with mock infection in all tested cell lines (Fig. 2E). In contrast, Delta-24-RGD infection did not significantly alter ATP concentrations in any cell line. Translocation of the endoplasmic reticulum–resident protein, CRT, to the cell surface of tumor cells is another well-known mechanism that contributes to the immunogenicity of tumor cells by acting as an “eat me” signal to promote tumor cell phagocytosis by macrophages (38). Early Delta-24-RGD infection triggered translocation of CRT to the plasma membrane (Fig. 2F). Thus, we concluded that Delta-24-RGD induces antitumor effects *in vitro*.

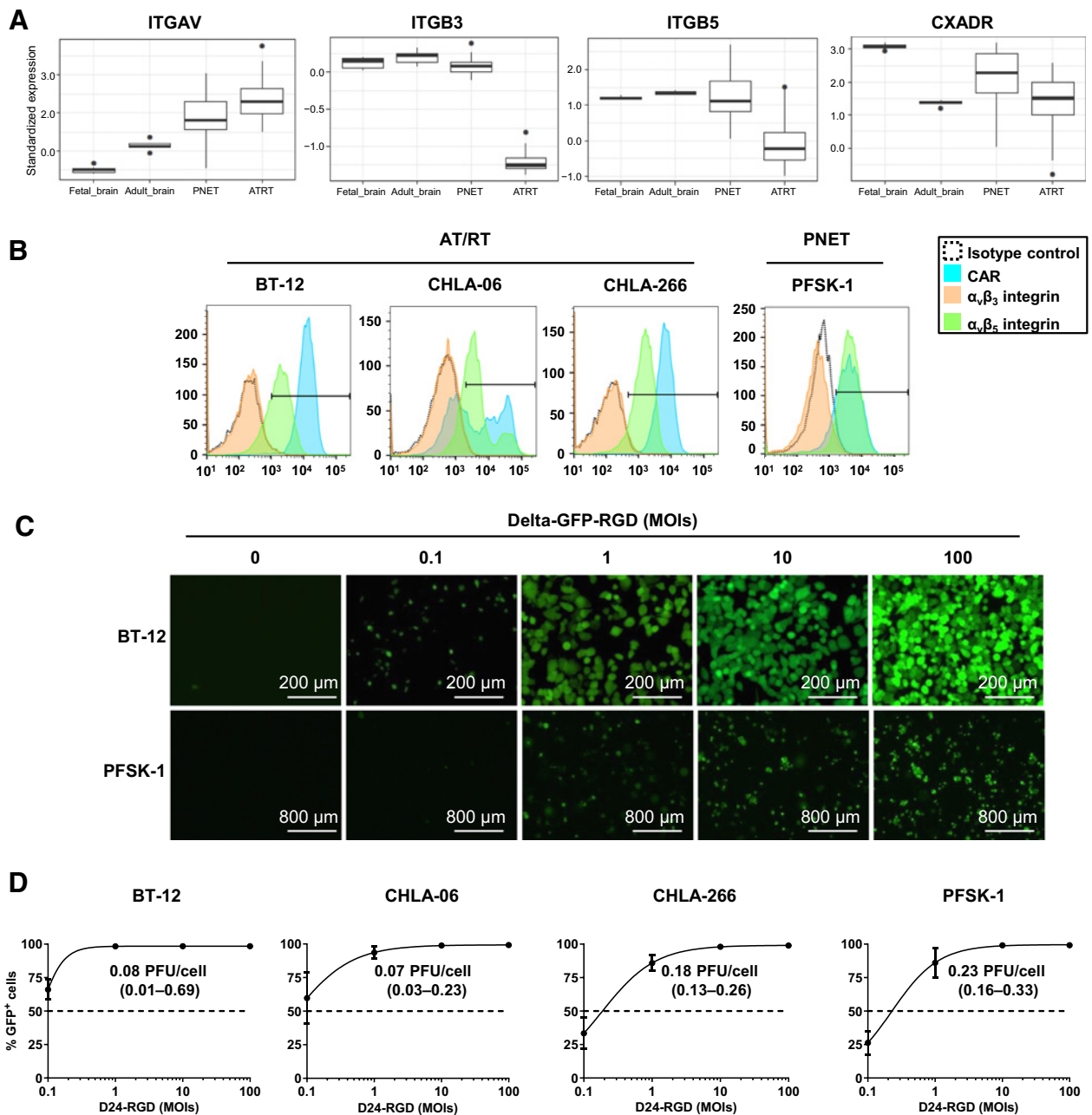


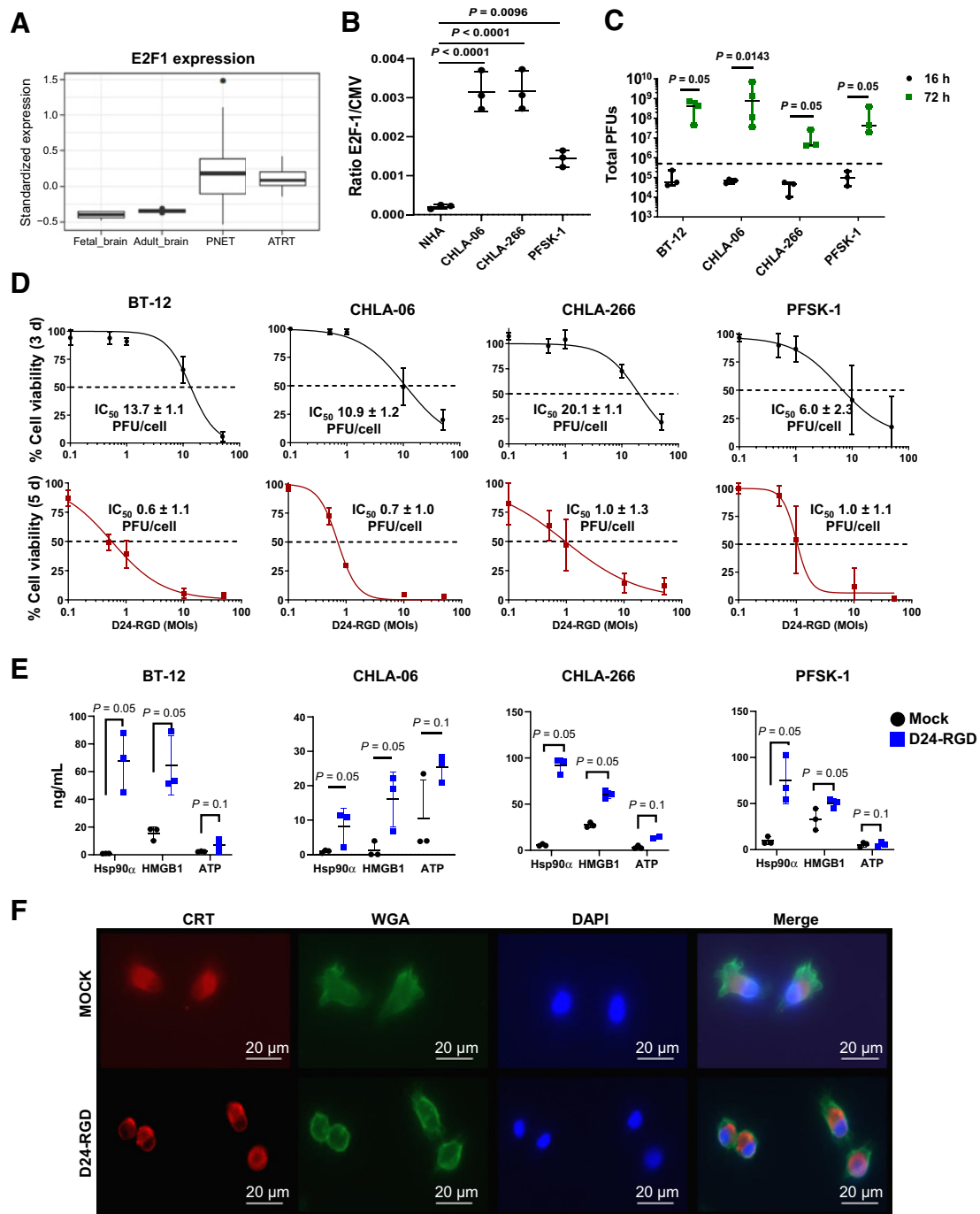
Figure 1.

Sensitivity of PNET and AT/RT cultures to Delta-24-RGD infection *in vitro*. **A**, Box plot showing mRNA levels of the Delta-24-RGD receptors, α_v (*ITGAV*), β_3 (*ITGB3*), and β_5 (*ITGB5*) integrins, and CAR (*CXADR*) in fetal and adult brain samples and PNET and AT/RT biopsies. **B**, Flow cytometry histograms of the expression levels of the adenoviral receptors, $\alpha_v\beta_3$ integrin, $\alpha_v\beta_5$ integrin, and CAR, in the AT/RT cell lines, BT-12, CHLA-06, and CHLA-266, and the PNET cell line, PFSK-1. Black lines indicate the fluorescence threshold to identify positive cells. **C**, Representative fluorescence images of BT-12 and CHLA-06 cell lines at 48 hours after infection with Delta-24-RGD-GFP at different MOIs ranging from 0 to 100 PFUs/cell. **D**, Infectivity of Delta-24-RGD in BT-12, CHLA-06, CHLA-266, and PFSK-1 cells measured by flow cytometry as the percentage of GFP⁺ cells at 48 hours postinfection with Delta-24-RGD-GFP at MOIs ranging from 0.1 to 100 PFUs/cell. Dots represent the mean GFP⁺ cells \pm SD ($n = 3$), and values indicate the MOI needed to infect 50% of the culture (95% CI).

Administration of Delta-24-RGD extends the overall survival of early and advanced PNET and AT/RT mouse models

Next, we investigated the therapeutic potential of Delta-24-RGD in mouse models of PNETs and AT/RTs. To this end, mice bearing orthotopically injected PFSK-1 cells were treated with a single intratumoral injection of Delta-24-RGD (10^7 or 10^8 PFUs/mouse) or PBS

(mock-treated group). The mice treated with the lowest dose of Delta-24-RGD did not show a significant increase in median survival; however, this treatment yielded 22% long-term survivors (2/9 mice) free of disease. The mice treated with the highest dose of Delta-24-RGD showed a significant increase in median survival, and 56% of the mice were long-term survivors (Fig. 3A). The long-term survivors

**Figure 2.**

Delta-24-RGD replication in AT/RT and PNET cultures mediates tumor cell death and DAMP release *in vitro*. **A**, Box plot showing the mRNA levels of E2F-1 in fetal and adult brain samples and PNET and AT/RT biopsies. **B**, Measurement of E2F-1 transcription factor activation in normal human astrocytes (NHA) and AT/RT (CHLA-06 and CHLA-266) and PNET (PFSK-1) cultures. Values are indicated as the ratio of E2F-1/CMV reporter signals (mean ± SD; $n = 3$; one-way ANOVA; $P < 0.0001$). **C**, Total viral infectious titers (PFUs) measured in BT-12, CHLA-06, CHLA-266, and PFSK-1 cultures at 16 (black) and 72 hours (green) after infection with Delta-24-RGD at an MOI of 10. Dashed lines indicate the total initial viral input (5×10^5 PFUs). Dots specify viral titers for each experimental replicate, and bars represent the median viral titer ± 95% CI ($n = 3/4$; one-tailed Mann-Whitney test). **D**, MTS assays to determine the percentages of viable BT-12, CHLA-06, CHLA-266, and PFSK-1 cells at 3 (black graphs) or 5 days (red graphs) after infection with Delta-24-RGD at 0.1, 0.5, 1, 10, or 50 PFUs/cell. Dots indicate the percentages of viable cells in infected cultures compared with those in noninfected cultures (mean ± SD, $n = 3$), and values indicate the mean IC₅₀ ± SD ($n = 3$). **E**, Concentrations of the DAMPs, Hsp90α, HMGB1, and ATP, in supernatants obtained from BT-12, CHLA-06, CHLA-266, and PFSK-1 cultures at 72 hours postinfection with Delta-24-RGD at the corresponding IC₅₀ values for each group or after mock infection. Bar graphs indicate the mean ± SD ($n = 3$; one-tailed Mann-Whitney test). **F**, Representative fluorescence microscopy images of CHLA-06 cultures at 4 hours after infection with Delta-24-RGD or mock infection. CRT at the cell surface was detected by immunofluorescence (red). Cell membranes (green) and nuclei (blue) were counterstained with wheat germ agglutinin (WGA) and DAPI, respectively.

were euthanized on day 97 after infection, and no visible tumor lesions were detected via H&E staining (Supplementary Fig. S3A). Histologic analyses performed at 14 days after injection revealed the presence of highly vascularized tumor masses spanning most of the right brain hemisphere in mock-treated mice. E1A and hexon staining in Delta-24-RGD-treated mice demonstrated *in vivo* infection and replication, respectively (Fig. 3B). Furthermore, activated microglia were found at a high density at the tumor edge, labeled with the marker Iba-1, and indicated tumor infiltration by reactive amoeboid microglia, which was in contrast with the resting microglia (stellate shape) present in most of the normal parenchyma (Fig. 3B). In addition, in Delta-24-RGD-treated mice, the highest degree of tumor infiltration by microglia was detected in areas that matched the infected areas, thus indicating that the virus induced substantial changes in the immune landscape surrounding the tumor microenvironment.

To determine whether the efficacy of this virus may be relevant to a broad range of different types of tumors *in vivo*, we next assessed the effects of Delta-24-RGD on PNET-like mouse models with primitive features, such as ETMRs and GBMs with PNET-like components. E1A and hexon staining confirmed that Delta-24-RGD infected and replicated in ETMR-induced tumors (BT-183 cell lines; Supplementary Fig. S3B). However, unlike in mice with PFSK-1 cell-induced PNETs, ETMRs showed no effects of treatment with Delta-24-RGD on tumor growth or infiltration of Iba-1-positive cells (microglia/macrophages). Unexpectedly, although replication of Delta-24-RGD was observed both *in vitro* and *in vivo*, survival curve comparisons showed no therapeutic benefit of Delta-24-RGD at the doses used to treat ETMR-induced tumors in mice (Supplementary Fig. S3C). Similar experiments were performed with the GBM PNET-like cell line, HB. Histologic analyses of HB tumors at 14 days after Delta-24-RGD treatment showed the presence of E1A and hexon proteins at the tumor site in the Delta-24-RGD-treated mice (Supplementary Fig. S3D). In this model, mice treated with the highest Delta-24-RGD dose displayed a significant increase in overall survival compared with mock-treated mice (Supplementary Fig. S3E).

Next, we assessed the antitumor effects of Delta-24-RGD on several AT/RT infratentorial models (CHLA-06, BT-12, and CHL-266 cells) following the protocol described above. At the highest dose, Delta-24-RGD treatment led to significant increases in median survival and long-term survival in the three models. The increase in median survival ranged from 10 days for CHL-06 tumors to 45 days for BT-12 and CHLA-266 tumors (Fig. 3C). The lowest dose tested also showed a significant improvement in the median survival of mice bearing CHL-06 tumors (13.5-day increase). Delta-24-RGD infection and replication were detected in tumor masses by E1A and hexon staining, respectively. Similar to PFSK-1 tumors, CHLA-06 tumors treated with Delta-24-RGD showed accumulation of microglia at the tumor rim and infiltration of reactive microglia, which were exacerbated in the Delta-24-RGD-containing regions of the tumors (Fig. 3D). Furthermore, the presence of the adenoviral proteins, E1A and hexon, was detected in tumor masses nearly 100 days after injection of Delta-24-RGD (Supplementary Fig. S4A and S4B), indicating that replication of the virus lasted as long as the time course of tumor cell propagation.

Because AT/RTs can also arise at supratentorial locations, CHLA-266 cells were engrafted orthotopically in the striatum (Fig. 3E). In this model, we observed a significant increase in the median survival of Delta-24-RGD-treated mice (39 days), and 29% of these mice (2/7) were long-term survivors with no symptoms of disease. These data underscore the therapeutic benefit of Delta-24-RGD in preclinical mouse models of localized AT/RTs *in vivo*.

Next, we addressed whether treatment with Delta-24-RGD could be effective in established tumors, which better recapitulate clinical conditions in human patients. Thus, we first established the time frames in which mice bearing PFSK-1 or CHLA-266 cells (supratentorial PNET and AT/RT models, respectively), as well as those bearing CHLA-06 cells (infratentorial AT/RT model), displayed visible tumors (Supplementary Fig. S4C). PFSK-1 and CHLA-06 tumor-bearing mice were treated 7 and 8 days after cell implantation, respectively, while treatment of CHLA-266 tumor-bearing mice was delayed to 29 days. Of importance, Delta-24-RGD treatment at the highest dose resulted in a significant increase in survival and led to long-term survival in the three models assessed. Moreover, the lowest dose also showed a significant benefit in the PFSK-1 and CHL266 models (Fig. 3F). Anatomopathologic analysis showed the capacity of the virus to spread through the tumors (Supplementary Fig. S4D). In addition, these analyses revealed ongoing infection and replication in the tumor mass (E1A and hexon staining, respectively), as well as a high degree of reactive microglial infiltration (Supplementary Fig. S4E). Furthermore, we observed an enrichment of reactive microglia at viral replication foci. These data indicate that virus treatment results in microglial activation.

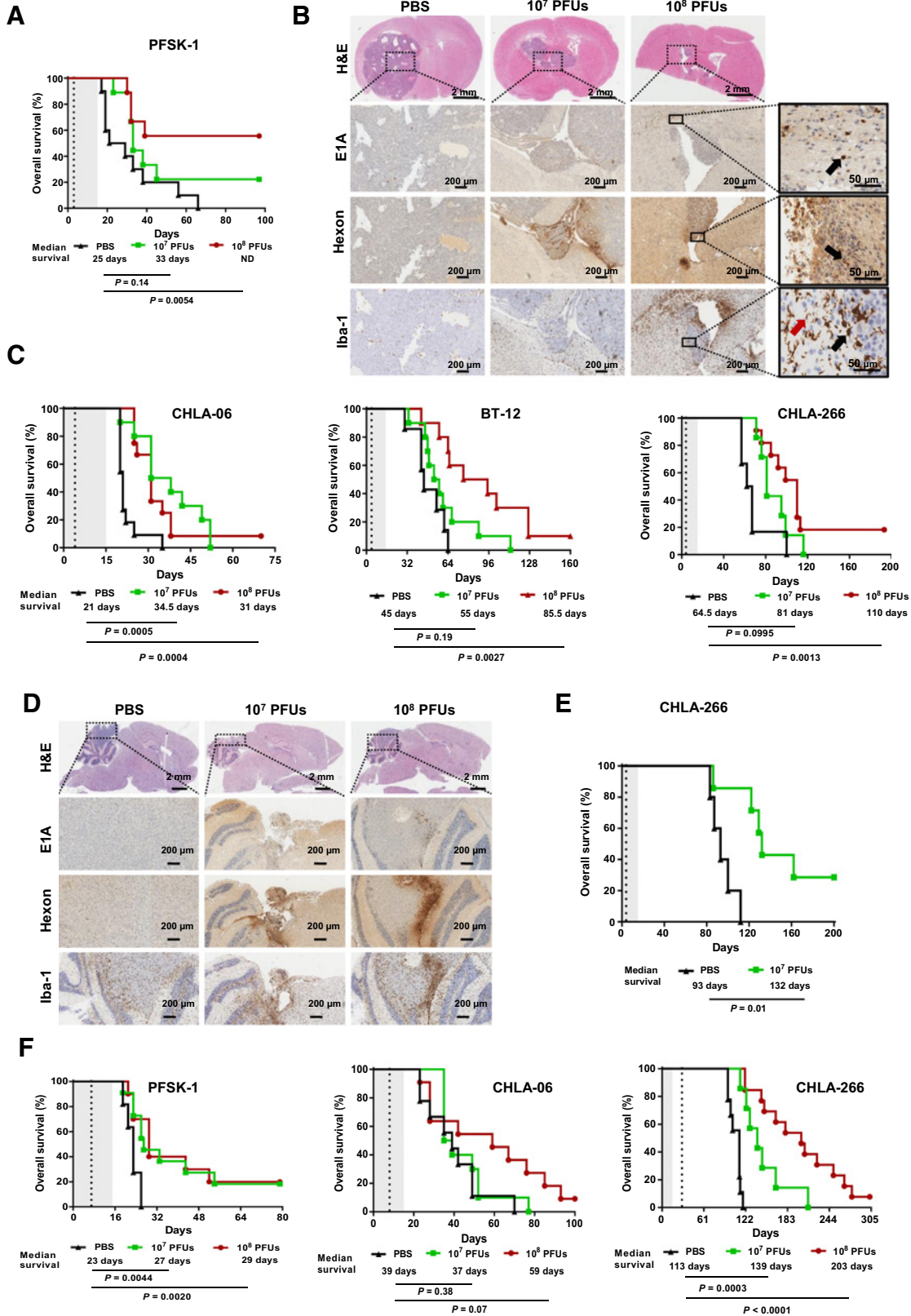
Delta-24-RGD treatment hinders the development of disseminated AT/RT lesions in preclinical mouse models

Because the presence of disseminated disease is a major hurdle in the efficacy of antitumor therapies in patients with AT/RT (39), we next evaluated the efficacy of Delta-24-RGD in a preclinical mouse model of this condition. Luminometry and histology in pilot studies confirmed that the BT-12 cell line was able to generate disseminated lesions upon intraventricular injection, as we observed luciferase signals at distal regions in the spinal cord and the presence of extracranial tumor lesions (Fig. 4A). *In vivo* experiments showed that by day 26, 58% of mock-treated mice developed secondary tumors (Fig. 4B). Bioluminescence images captured at early stages (days 11 and 22) revealed that Delta-24-RGD-treated mice displayed a significantly lower tumor burden than mock-treated mice (Fig. 4C-E). Regarding the efficacy of Delta-24-RGD in this disseminated model, administration of the lower dose (10^7 PFUs) increased median survival by 21.5 days and produced two long-term survivor animals; however, the difference was not significant. In contrast, treatment with the highest Delta-24-RGD dose (10^8 PFUs) significantly increased median survival compared with PBS-treated mice and led to 70% of the mice becoming long-term survivors (Fig. 4F). Anatomopathologic analysis of the spinal cord of long-term survivors revealed that they were free of disease (Supplementary Fig. S4F). These data underscore the antitumor effect of Delta-24-RGD even in the context of disseminated disease.

Delta-24-RGD induces an antitumor immune response in humanized PNET and AT/RT models

Previous preclinical and clinical data have provided evidence that Delta-24-RGD enhances the antitumor immune response in brain tumors (20, 22, 40). Therefore, we evaluated the effects of Delta-24-RGD in an immunocompetent background using NSG-SMG3 mice humanized with hCD34⁺ progenitor cells that recapitulate both the innate and adaptive branches of the immune system (41). HLA typing was performed in PNET and AT/RT cell lines with the aim of choosing a donor with at least HLA-A matching (Supplementary Materials and Methods).

Survival studies demonstrated that treatment of mice bearing PFSK-1 or CHLA-06 cells with a single injection of Delta-24-RGD



(10^8 PFUs) resulted in a significant increase in overall survival compared with mock treatment (28 vs. 55 days for PFSK-1 cells and 23 vs. 34 days for CHLA-06 cells; **Fig. 5A** and **B**). Moreover, one animal survived the PFSK-1 challenge at the end of the study (**Fig. 5A**). Assessment of mouse body weight throughout the experiment revealed no signs of toxicity associated with virus-mediated inflammation induced by Delta-24-RGD (Supplementary Fig. S5A).

Histologic analyses of brain samples from CHLA-06 tumor-bearing mice indicated ongoing viral infection and replication in Delta-24-RGD-treated mice (**Fig. 5C**). Multispectral immunofluorescence panels of different immune populations revealed that most immune cells accumulated in the tumor-invasive margin (**Fig. 5C**; Supplementary Fig. S5B) and in Delta-24-RGD-containing regions (**Fig. 5C**). In both Delta-24-RGD-treated mice and mock-treated mice, the presence of CD20⁺ B cells was nearly negligible (**Fig. 5D**). Furthermore, Delta-24-RGD also induced reductions in the frequency of CD68⁺ cells (macrophages) in the tumor and at the invasive margin, although the reduction was less pronounced at the latter site. No differences were observed in terms of the total CD11b⁺ myeloid population, although the antibody that was used also detects the murine orthologue; thus, this particular assessment may have been hampered by the high abundance of mouse microglia. Interestingly, even though no differences were observed between the groups in regard to total T cells (CD3⁺), there was a remarkable increase in the CD8⁺ subpopulation in the Delta-24-RGD-treated group, which was nearly absent in the mock-treated group. To validate our results, the multispectral immunofluorescence results were confirmed by conventional IHC (Supplementary Fig. S5C).

Surprisingly, PFSK-1 tumors showed no evidence of viral infection or T-cell infiltration despite observation of clear therapeutic effects (**Fig. 5E**). Nevertheless, analysis of the macrophage/microglial marker, Iba-1, revealed pronounced activation and recruitment of these cells at the tumor margin in Delta-24-RGD-treated mice.

Finally, survival experiments were performed for an ETMR model (BT-183) established with humanized mice. However, although no signs of toxicity were observed (Supplementary Fig. S5D), Delta-24-RGD showed no therapeutic benefit (Supplementary Fig. S5E), and there was no T-cell infiltration despite evidence of replication of Delta-24-RGD (Supplementary Fig. S5F).

Although the outcomes of the different models were variable, these results are encouraging and may reflect the heterogeneity of the type of tumor, donor, and immune response (T-cell responses vs. predominant macrophage activation).

Discussion

Potential tumor targets of Delta-24-RGD must be permissive to viral infection and replication. We confirmed previously the expression of adenoviral receptors and the transcription factor, E2F-1, in gene expression datasets from tumor biopsies (42, 43), providing direct translational relevance. Unlike the common features of other brain tumors, canonical oncogenic mutations in components of the pRb-E2F pathway, such as *CDK4/CCND1* amplification and *CDKN2A/B* deletion, are uncommon in CNS-PNETs (44, 45) and are nearly absent in AT/RTs (46, 47). Nonetheless, epigenetic deregulation mediated by loss of SMARCB1 in AT/RTs, as well as loss of p53 and amplification of different tyrosine kinases, results in aberrant cell-cycle progression that allows viral replication.

Although virotherapy has been evaluated in embryonal tumors, mainly medulloblastomas (48–51), there is a paucity of preclinical studies investigating these types of tumors. Nonetheless, an oncolytic measles virus was found to have therapeutic effects on localized and disseminated models of AT/RTs (32). Another oncolytic adenovirus, VCN-01 (armed with hyaluronidases), was demonstrated to be efficacious in a model of supratentorial PNETs (52). These previous findings together with our current results underscore the potential of virotherapies and the need to translate them to clinical trials.

Despite our use of immunodeficient mice in this study, our *in vivo* models still developed immune responses in the myeloid compartments, and we observed that Delta-24-RGD triggered tumor infiltration of amoeboid reactive microglia, thus underscoring the ability of this virus to “warm” the tumor microenvironment to a proinflammatory status, which might contribute to enhancing antitumor immune responses (53). In our humanized mouse AT/RT model, we observed a decrease in the frequency of CD68⁺ cells after Delta-24-RGD treatment, which has been proposed to negatively impact the survival of patients with MYC-AT/RTs (54). Therefore, we speculate that Delta-24-RGD may have a direct effect on this population, inducing remodeling of the tumor microenvironment and stimulating the expansion and activity of CD8⁺ CTLs to exert their antitumor effects. Interestingly, in the PFSK-1-humanized model, although we could not detect viral replication or T-cell infiltration, we observed the existence of reactive glia. These data are in agreement with a potential antitumor immune response. However, it might be that at 15 days, the immune response was already fading. In addition, we cannot rule out the possibility that other mechanisms were taking place (i.e., early innate response and cytotoxicity), and further studies are needed to test this hypothesis.

Figure 3.

Administration of Delta-24-RGD extends the overall survival of early and advanced PNET and AT/RT mouse models. **A**, Survival curve comparisons between mice bearing supratentorial PFSK-1 tumors that were either mock treated (PBS) or treated with 10^7 or 10^8 PFUs of Delta-24-RGD ($P < 0.022$; log-rank test). The table below the survival graph contains the median survival and significance of comparisons between the 10^7 or 10^8 PFU-treated group and the mock-treated group. The dashed vertical line indicates administration of the virus. **B**, Representative images of mice bearing supratentorial PFSK-1 tumors at 14 days after treatment with PBS or 10^7 or 10^8 PFUs of Delta-24-RGD. Tumors were stained with H&E and immunostained for the adenoviral proteins, E1A and hexon, as well as the microglial marker, Iba-1. The magnification at the bottom right corner has been included to illustrate differential morphology between resting stellar-shaped microglia (red arrow) and activated amoeboid microglia (black arrow). **C**, Survival curve comparisons (log-rank test) between mice bearing infratentorial (cerebellar) CHLA-06, BT-12, and CHLA-266 tumors that were mock treated (PBS) or treated with 10^7 or 10^8 PFUs of Delta-24-RGD. The table below the survival graph contains the median survival and significance of comparisons between the 10^7 or 10^8 PFU-treated group and the mock-treated group. **D**, Representative images of CHLA-06 tumors at 14 days after treatment with PBS or 10^7 or 10^8 PFUs of Delta-24-RGD. Tumors were stained with H&E and immunostained for the adenoviral proteins, E1A and hexon, as well as the microglial marker, Iba-1. **E**, Survival curve comparisons (log-rank test) between mice bearing supratentorial CHLA-266 tumors that were mock treated (PBS) or treated with 10^7 PFUs of Delta-24-RGD. The table below the survival graph contains the median survival and significance of the comparison between the 10^7 PFU-treated group and the mock-treated group. Dashed vertical lines in survival plots indicate administration of Delta-24-RGD. **F**, Survival curves and comparisons (log-rank test) in different tumor models that were either mock treated with PBS or treated with Delta-24-RGD (10^7 and 10^8 PFUs). In supratentorial PNET experiments, PFSK-1 tumors were treated on day 7, infratentorial CHLA-06 AT/RTs were treated on day 8, and supratentorial CHLA-266 AT/RTs were treated on day 29. The table below the survival graph contains the median survival and significance of comparisons between the 10^7 PFU-treated group and the mock-treated group. Dashed vertical lines in survival plots indicate administration of Delta-24-RGD.

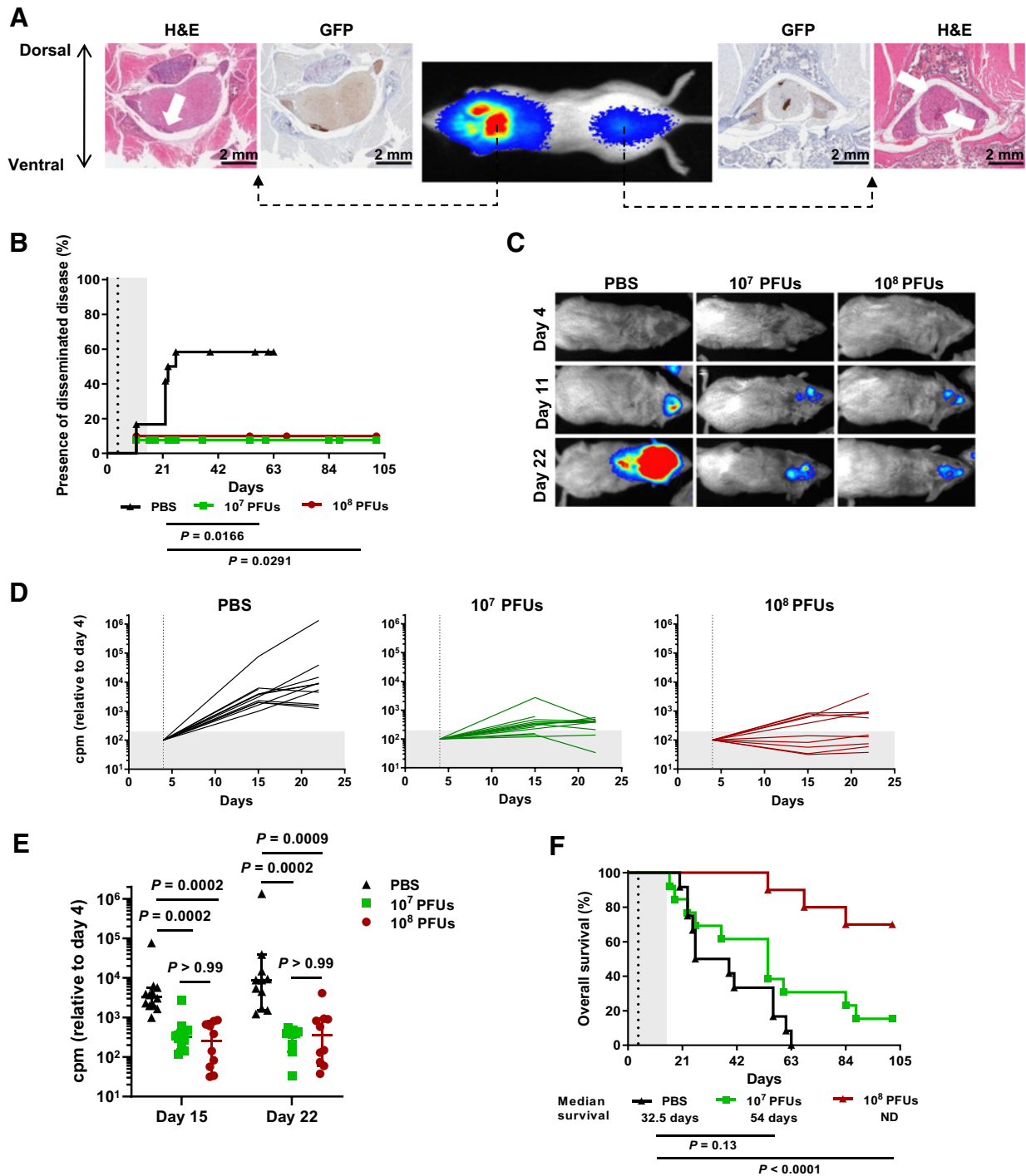
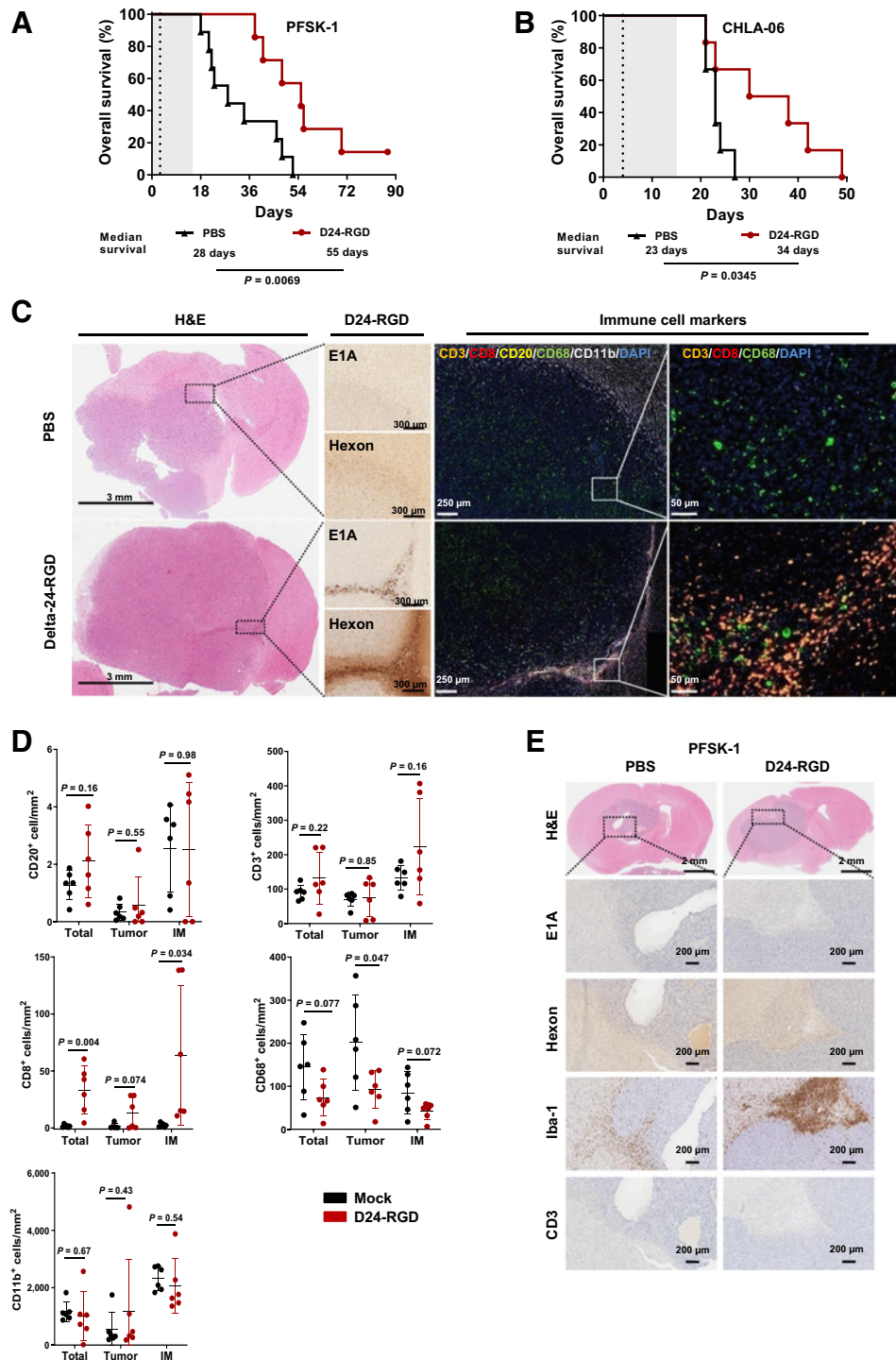


Figure 4.

Delta-24-RGD hinders the development of disseminated AT/RT lesions. **A**, Representative bioluminescence images of mice at 21 days after intraventricular administration of BT-12-luc/GFP cells showing the presence of luciferase signals at cranial and spinal locations. H&E and GFP staining demonstrated that the luciferase signals corresponded to local and disseminated tumor lesions. **B**, Kaplan-Meier plot comparing the development of secondary AT/RT BT-12 tumors (log-rank test). Dots on the survival curves indicate death events. **C**, Representative images of mice developing disseminated tumors acquired on days 4 (day of treatment), 11, and 22 after injection of BT-12-luc cells into the right ventricle. **D**, Evolution of tumor growth measured as luminometry signals in mice treated with 10^7 or 10^8 PFUs of Delta-24-RGD or mock treated with PBS. The total counts per minute (cpm) measured in whole mice were normalized to the intensity of the signal on the day of treatment (dashed vertical line). **E**, Analysis of differences in tumor sizes among the three experimental groups at days 15 and 22 after injection of tumor cells. Each dot represents an individual value, and bars indicate the median cpm \pm 95% CI (Kruskal-Wallis test, Dunn correction). **F**, Survival curve comparisons between mice bearing intraventricular BT-12 tumors that were mock treated (PBS) or treated with 10^7 or 10^8 PFUs of Delta-24-RGD (log-rank test). Dashed vertical lines in survival plots indicate administration of Delta-24-RGD.

**Figure 5.**

Therapeutic effect of Delta-24-RGD on immunocompetent humanized mice. Survival curve comparisons (log-rank test) between Delta-24-RGD- and PBS-treated humanized mice bearing supratentorial PFSK-1 (**A**) or CHLA-06 (**B**) tumors. Dashed vertical lines indicate administration of Delta-24-RGD. **C**, Representative images of brain sections obtained from humanized mice bearing CHLA-06 tumors. Samples were stained with H&E and immunostained for the viral proteins, E1A and hexon; furthermore, they were subjected to multiplexed immunofluorescence to detect the following immune cell markers: CD3 (orange), CD8 (red), CD20 (yellow), CD68 (green), and CD11b (white). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). **D**, Quantification of immune cell populations identified by multiplexed immunofluorescence in the whole tumor (total), central tumor region (tumor), and invasive margin of the tumor (IM). Bars indicate the mean \pm SD ($n = 6$; each dot represents the mean stamps counted/mouse), and Student *t* tests were used for comparisons between PBS (black) and Delta-24-RGD (red) treatments in each region. **E**, Representative histologic staining images of brain sections from humanized mice bearing PFSK-1 tumors. Whole tumors were stained with H&E or immunostained for the viral proteins, E1A and hexon, and the immune cell markers, Iba-1 and CD3.

One of the limitations of this study was the paucity of preclinical models. First, the availability of well-characterized human-derived CNS-PNET models is scarce; therefore, tumor models do not recapitulate the variability found in patients. Second, human adenoviruses do not exhibit high levels of replication in murine cells (55), so the oncolytic and immunostimulatory properties of Delta-24-RGD must be evaluated independently using human xenografts and syngeneic models, respectively (20). Transgenic mouse models have already been developed for spontaneous CNS-PNETs, AT/RTs, and ETMRs (56–58); however, these mice suffer from severe health conditions, and spontaneous tumor models are difficult to treat via intratumoral injections. The development of stable cell cultures from these tumors may be a desirable approach to overcome these difficulties. In this study, we used humanized mice as an approach to evaluate the combined effects of viral replication and immunomodulation because such mice allow the study of xenografted human tumors in an immunocompetent environment. However, this model is *per se* complex and presents with intrinsic limitations, such as the age of the mice used in the analyses. Because of the engraftment process of human CD34⁺ cells, these mice are already adults by the time they can be used in experiments (~15 weeks) and are, therefore, not an ideal model for trying to assess the immune system of children. Another important issue is the HLA matching of the immune system of donor and tumor. Therefore, caution should be exerted when making definitive conclusions, and further studies are required to understand this process in depth.

In summary, we demonstrated that treatment with the oncolytic adenovirus, Delta-24-RGD, is a potential therapeutic approach for AT/RTs and PNETs. Our data showed that virus administration was safe and effective in controlling local, both supratentorial and infratentorial, advanced, and disseminated tumors in models of AT/RTs and CNS-PNETs. These encouraging data open the door for oncolytic viruses to be considered serious candidates in the treatment of pediatric brain tumors and strongly support initiating clinical studies.

Authors' Disclosures

S. Labiano reports personal fees from Roche Pharma Research & Early Development outside the submitted work. J.A. Chan reports grants from Kids Cancer Care Foundation of Alberta/Alexander's Quest fund and Alberta Children's Hospital Foundation during the conduct of the study. C. Gomez-Manzano reports grants from Department of Defense during the conduct of the study, other from DNAtrix, Inc. outside the submitted work, as well as has a patent covering Delta-24-RGD to DNAtrix. J. Fueyo reports grants from Department of Defense during the conduct of the study, other from DNAtrix, Inc. outside the submitted work, as well as has a patent for IP for Delta-24-RGD licensed to DNAtrix, Inc. M.M. Alonso reports grants from DNAtrix outside the submitted work. No disclosures were reported by the other authors.

References

- Ostrom QT, Gittleman H, Truitt G, Boscia A, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2011–2015. *Neuro Oncol* 2018;20:iv1–86.
- Ostrom QT, de Blank PM, Kruchko C, Petersen CM, Liao P, Finlay JL, et al. Alex's Lemonade Stand Foundation infant and childhood primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007–2011. *Neuro Oncol* 2015;16:x1–35.
- Adesina AM, Yachnis AT. Pathology of embryonal tumors. *Medscape* 2018. Available from: <https://emedicine.medscape.com/article/1962091-overview>.
- McGovern SL, Grosshans D MA. Embryonal brain tumors. *Cancer J* 2014; 20:397.
- Biswas A, Kashyap L, Kakkar A, Sarkar C, Julka PK. Atypical teratoid/rhabdoid tumors: challenges and search for solutions. *Cancer Manag Res* 2016;8:115–25.
- Biegel JA, Zhou JY, Rorke LB, Stenstrom C, Wainwright LM, Fogelgren B. Germ-line and acquired mutations of INI1 in atypical teratoid and rhabdoid tumors. *Cancer Res* 1999;59:74–9.
- Haberler C, Laggner U, Slavc I, Czech T, Ambros IM, Ambros PF, et al. Immunohistochemical analysis of INI1 protein in malignant pediatric CNS tumors: lack of INI1 in atypical teratoid/rhabdoid tumors and in a fraction of primitive neuroectodermal tumors without rhabdoid phenotype. *Am J Surg Pathol* 2006;30:1462–8.
- Biswas A, Kashyap L, Kakkar A, Sarkar C, Julka PK. Atypical teratoid/rhabdoid tumors: challenges and search for solutions. *Cancer Manag Res* 2016;8:115–25.
- Ostrom QT, Chen Y, De Blank PM, Ondracek A, Farah P, Gittleman H, et al. The descriptive epidemiology of atypical teratoid/rhabdoid tumors in the United States, 2001–2010. *Neuro Oncol* 2014;16:1392–9.

Authors' Contributions

M. Garcia-Moure: Conceptualization, data curation, formal analysis, supervision, validation, investigation, visualization, methodology, writing-original draft, writing-review and editing. **M. Gonzalez-Huarriz:** Conceptualization, data curation, formal analysis, investigation, visualization, methodology, writing-review and editing. **S. Labiano:** Data curation, formal analysis, investigation, visualization, methodology, writing-review and editing. **E. Guruceaga:** Data curation, formal analysis, investigation, visualization, methodology, writing-review and editing. **E. Bandres:** Data curation, investigation, methodology, writing-review and editing. **M. Zalacain:** Data curation, investigation, methodology, writing-review and editing. **L. Marrocan:** Data curation, investigation, methodology, writing-review and editing. **C. de Andrea:** Data curation, formal analysis, investigation, visualization, methodology, writing-review and editing. **M. Villalba:** Data curation, formal analysis, investigation, visualization, methodology, writing-review and editing. **N. Martinez-Velez:** Data curation, investigation, methodology, writing-review and editing. **V. Laspidea:** Data curation, investigation, methodology, writing-review and editing. **M. Puigdellos:** Data curation, investigation, methodology, writing-review and editing. **J. Gallego Perez-Larraya:** Data curation, investigation, methodology, writing-review and editing. **I. Inigo-Marco:** Data curation, investigation, methodology, writing-review and editing. **R. Striecke:** Data curation, investigation, methodology, writing-review and editing. **J.A. Chan:** Data curation, investigation, methodology, writing-review and editing. **E.H. Raabe:** Data curation, investigation, methodology, writing-review and editing. **M. Kool:** Data curation, formal analysis, investigation, methodology, writing-review and editing. **C. Gomez-Manzano:** Data curation, formal analysis, investigation, methodology, writing-review and editing. **J. Fueyo:** Data curation, formal analysis, investigation, methodology, writing-review and editing. **A. Patiño-García:** Data curation, formal analysis, investigation, methodology, writing-review and editing. **M.M. Alonso:** Conceptualization, data curation, formal analysis, supervision, funding acquisition, investigation, visualization, methodology, writing-original draft, project administration, writing-review and editing.

Acknowledgments

We thank Nature Authors Services for its linguistic assistance during the preparation of this article. The performed work was supported through the Departamento de Salud del Gobierno de Navarra (54/2018-APG), Predoctoral Fellowship from Gobierno de Navarra (to V. Laspidea), Instituto de Salud Carlos III y Fondos Feder (PI19/01896 MMA, PI18/00164 to A. Patiño-García), Amigos de la Universidad de Navarra (to M. Puigdellos), Fundación La Caixa/Caja Navarra (to A. Patiño-García and M.M. Alonso), Fundación El sueño de Vicky, Asociación Pablo Ugarte-FuerzaJulen (to A. Patiño-García and M.M. Alonso), and Department of Defense (DOD) Team Science Award under grant (CA 160525 MMA to C. Gomez-Manzano and J. Fueyo). This project also received funding from the European Research Council under the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme (817884 ViroPedTher to M.M. Alonso).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received August 26, 2020; revised October 14, 2020; accepted December 22, 2020; published first December 29, 2020.

10. Packer RJ, Biegel JA, Blaney S, Finlay J, Russell Geyer J, Heideman R, et al. Atypical teratoid/rhabdoid tumor of the central nervous system: report on workshop. *J Pediatr Hematol Oncol* 2002;24:337–42.
11. Gajjar A, Bowers DC, Karajannis MA, Leary S, Witt H, Gottardo NG. Pediatric brain tumors: innovative genomic information is transforming the diagnostic and clinical landscape. *J Clin Oncol* 2015;33:2986–98.
12. 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* 2016; 131:803–20.
13. Friedrich C, von Bueren AO, von Hoff K, Gerber NU, Ottensmeier H, Deinlein F, et al. Treatment of young children with CNS-primitive neuroectodermal tumors/pineoblastomas in the prospective multicenter trial HIT 2000 using different chemotherapy regimens and radiotherapy. *Neuro Oncol* 2013;15:224–34.
14. Jakacki RI, Burger PC, Kocak M, Boyett JM, Goldwein J, Mehta M, et al. Outcome and prognostic factors for children with supratentorial primitive neuroectodermal tumors treated with carboplatin during radiotherapy: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer* 2015;62:776–83.
15. Zhang WW. Development and application of adenoviral vectors for gene therapy of cancer. *Cancer Gene Ther* 1999;6:113–38.
16. Rodriguez-Garcia A, Gimenez-Alejandre M, Rojas JJ, Moreno R, Bazan-Peregrino M, Cascallo M, et al. Safety and efficacy of VCN-01, an oncolytic adenovirus combining fiber HSG-binding domain replacement with RGD and hyaluronidase expression. *Clin Cancer Res* 2015;21:1406–18.
17. Fueyo J, Gomez-Manzano C, Alemany R, Lee PSY, McDonnell TJ, Mitlianga P, et al. A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect *in vivo*. *Oncogene* 2000;19:2–12.
18. Dai B, Roife D, Kang Y, Gumin J, Rios Perez M V, Li X, et al. Preclinical evaluation of sequential combination of oncolytic adenovirus Delta-24-RGD and phosphatidylserine-targeting antibody in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther* 2017;16:662–70.
19. Garcia-Moure M, Martinez-Vélez N, Patiño-García A, Alonso MMM. Oncolytic adenoviruses as a therapeutic approach for osteosarcoma: a new hope. *J Bone Oncol* 2017;9:41–7.
20. Martínez-Vélez N, Garcia-Moure M, Marigil M, González-Huarriz M, Puigdelloses M, Gallego Pérez-Larraya J, et al. The oncolytic virus Delta-24-RGD elicits an antitumor effect in pediatric glioma and DIPG mouse models. *Nat Commun* 2019;10:2235.
21. Kimball KJ, Preuss MA, Barnes MN, Wang M, Siegal GP, Wan W, et al. A phase I study of a tropism-modified conditionally replicative adenovirus for recurrent malignant gynecologic diseases. *Clin Cancer Res* 2010;16:5277–87.
22. Lang FF, Conrad C, Gomez-Manzano C, Alfred Yung WK, 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;36:1419–27.
23. Lang FF, Conrad C, Gomez-Manzano C, Tufaro F, Yung W, Sawaya R, et al. First-in-human phase I clinical trial of oncolytic delta-24-RGD (DNX-2401) with biological endpoints: implications for viro-immunotherapy. *Neuro Oncol* 2014; 16:iii39–iii39.
24. Tejada S, Alonso M, Patiño A, Fueyo J, Gomez-Manzano C, Diez-Valle R. Phase I trial of DNX-2401 for diffuse intrinsic pontine glioma newly diagnosed in pediatric patients. *Neurosurgery* 2018;83:1050–6.
25. Tejada S, Diez-Valle R, Dominguez PD, Patiño-García A, González-Huarriz M, Fueyo J, et al. DNX-2401, an oncolytic virus, for the treatment of newly diagnosed diffuse intrinsic pontine gliomas: a case report. *Front Oncol* 2018;8:61.
26. Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* 2003;31:e15–e15.
27. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 2004;5:R80.
28. Alonso MM, Cascallo M, Gomez-Manzano C, Jiang H, Bekele BN, Perez-Gimenez A, et al. ICovIR-5 shows E2F1 addiction and potent anti-glioma effect *in vivo*. *Cancer Res* 2007;67:8255–63.
29. Cascallo M, Gros A, Bayo N, Serrano T, Capella G, Alemany R. Deletion of VAI and VAI RNA genes in the design of oncolytic adenoviruses. *Hum Gene Ther* 2006;17:929–40.
30. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55–63.
31. Lal S, Lacroix M, Tofilon P, Fuller GN, Sawaya R, Lang FF. An implantable guide-screw system for brain tumor studies in small animals. *J Neurosurg* 2000;92: 326–33.
32. Studebaker AW, Hutzen B, Pierson CR, Shaffer TA, Raffel C, Jackson EM. Oncolytic measles virus efficacy in murine xenograft models of atypical teratoid rhabdoid tumors. *Neuro Oncol* 2015;17:1568–77.
33. Abengozar-Muela M, Esparza MV, Garcia-Ros D, Vázquez CE, Echeveste JI, Idoate MA, et al. Diverse immune environments in human lung tuberculosis granulomas assessed by quantitative multiplexed immunofluorescence. *Mod Pathol* 2020;33:2507–19.
34. Martínez-Valbuena I, Valenti-Azcarate R, Amat-Villegas I, Riverol M, Marcilla I, de Andrea CE, et al. Amylin as a potential link between type 2 diabetes and Alzheimer disease. *Ann Neurol* 2019;86:539–51.
35. Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, et al. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 1997;275:1320–3.
36. Coyne CB, Bergelson JM. CAR: a virus receptor within the tight junction. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:869–82.
37. Spence T, Perotti C, Sin-Chan P, Picard D, Wu W, Singh A, et al. A novel C19MC amplified cell line links Lin28/let-7 to mTOR signaling in embryonal tumor with multilayered rosettes. *Neuro Oncol* 2014;16:62–71.
38. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini J-L, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 2007;13:54–61.
39. Buscariollo DL, Park HS, Roberts KB, Yu JB. Survival outcomes in atypical teratoid rhabdoid tumor for patients undergoing radiotherapy in a Surveillance, Epidemiology, and End Results analysis. *Cancer* 2012;118:4212–9.
40. Jiang H, Clise-Dwyer K, Ruisaard KE, Fan X, Tian W, Gumin J, et al. Delta-24-RGD oncolytic adenovirus elicits anti-glioma immunity in an immunocompetent mouse model. *PLoS One* 2014;9:e97407.
41. Billerbeck E, Barry WT, Mu K, Dorner M, Rice CM, Ploss A. Development of human CD4+FoxP3+ regulatory T cells in human stem cell factor-, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-, and interleukin-3-expressing NOD-SCID IL2R γ null humanized mice. *Blood* 2011;117:3076–86.
42. Li M, Lee KF, Lu Y, Clarke I, Shih D, Eberhart C, et al. Frequent amplification of a chr19q13.41 microRNA polycistron in aggressive primitive neuroectodermal brain tumors. *Cancer Cell* 2009;16:533–46.
43. Johann PD, Erkek S, Zapatka M, Kerl K, Buchhalter I, Hovestadt V, et al. Atypical teratoid/rhabdoid tumors are comprised of three epigenetic subgroups with distinct enhancer landscapes. *Cancer Cell* 2016;29:379–93.
44. Li M, Lockwood W, Zielenska M, Northcott P, Ra YS, Bouffet E, et al. Multiple CDK/CYCLIND genes are amplified in medulloblastoma and supratentorial primitive neuroectodermal brain tumor. *Cancer Genet* 2012;205:220–31.
45. Picard D, Miller S, Hawkins CE, Bouffet E, Rogers HA, Chan TSY, et al. Markers of survival and metastatic potential in childhood CNS primitive neuroectodermal brain tumours: an integrative genomic analysis. *Lancet Oncol* 2012;13:838–48.
46. Lee RS, Stewart C, Carter SL, Ambrogio L, Cibulskis K, Sougnez C, et al. A remarkably simple genome underlies highly malignant pediatric rhabdoid cancers. *J Clin Invest* 2012;122:2983–8.
47. Kieran MW, Roberts CWM, Chi SN, Ligon KL, Rich BE, MacConaill LE, et al. Absence of oncogenic canonical pathway mutations in aggressive pediatric rhabdoid tumors. *Pediatr Blood Cancer* 2012;59:1155–7.
48. Friedman GK, Moore BP, Nan L, Kelly VM, Etminan T, Langford CP, et al. Pediatric medulloblastoma xenografts including molecular subgroup 3 and CD133+ and CD15+ cells are sensitive to killing by oncolytic herpes simplex viruses. *Neuro Oncol* 2016;18:227–35.
49. Lal S, Carrera D, Phillips JJ, Weiss WA, Raffel C. An oncolytic measles virus-sensitive group 3 medulloblastoma model in immune-competent mice. *Neuro Oncol* 2018;20:1606–15.
50. Studebaker AW, Hutzen BJ, Pierson CR, Haworth KB, Cripe TP, Jackson EM, et al. Oncolytic herpes virus rRp450 shows efficacy in orthotopic xenograft group 3/4 medulloblastomas and atypical teratoid/rhabdoid tumors. *Mol Ther Oncolytics* 2017;6:22–30.
51. Varela-Guruceaga M, Tejada-Solis S, Garcia-Moure M, Fueyo J, Gomez-Manzano C, Patiño-García A, et al. Oncolytic viruses as therapeutic tools for pediatric brain tumors. *Cancers* 2018;10:226.
52. Garcia-Moure M, Martínez-Vélez N, González-Huarriz M, Marrodán L, Cascallo M, Alemany R, et al. The oncolytic adenovirus VCN-01 promotes anti-tumor effect in primitive neuroectodermal tumor models. *Sci Rep* 2019;9:1–10.

53. Glass R, Synowitz M. CNS macrophages and peripheral myeloid cells in brain tumours. *Acta Neuropathol* 2014;128:347–62.
54. Melcher V, Graf M, Interlandi M, Moreno N, de Faria FW, Kim SN, et al. Macrophage-tumor cell interaction promotes ATRT progression and chemoresistance. *Acta Neuropathol* 2020;139:913–36.
55. Jogler C, Hoffmann D, Theegarten D, Grunwald T, Uberla K, Wildner O. Replication properties of human adenovirus *in vivo* and in cultures of primary cells from different animal species. *J Virol* 2006;80:3549–58.
56. Beckmann PJ, Larson JD, Larsson AT, Ostergaard JP, Wagner S, Rahrman EP, et al. Sleeping beauty insertional mutagenesis reveals important genetic drivers of central nervous system embryonal tumors. *Cancer Res* 2019;79:905–17.
57. Ng JMY, Martinez D, Marsh ED, Zhang Z, Rappaport E, Santi M, et al. Generation of a mouse model of atypical teratoid/rhabdoid tumor of the central nervous system through combined deletion of *Snf5* and *p53*. *Cancer Res* 2015;75:4629–39.
58. Neumann JE, Wefers AK, Lambo S, Bianchi E, Bockstaller M, Dorostkar MM, et al. A mouse model for embryonal tumors with multilayered rosettes uncovers the therapeutic potential of Sonic-hedgehog inhibitors. *Nat Med* 2017;23:1191–202.

Clinical Cancer Research

Delta-24-RGD, an Oncolytic Adenovirus, Increases Survival and Promotes Proinflammatory Immune Landscape Remodeling in Models of AT/RT and CNS-PNET

Marc Garcia-Moure, Marisol Gonzalez-Huarriz, Sara Labiano, et al.

Clin Cancer Res Published OnlineFirst December 29, 2020.

Updated version	Access the most recent version of this article at: doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-3313
Supplementary Material	Access the most recent supplemental material at: http://clincancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2020/12/29/1078-0432.CCR-20-3313.DC1

E-mail alerts [Sign up to receive free email-alerts](#) related to this article or journal.

Reprints and Subscriptions To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org.

Permissions To request permission to re-use all or part of this article, use this link <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/early/2021/01/26/1078-0432.CCR-20-3313>. Click on "Request Permissions" which will take you to the Copyright Clearance Center's (CCC) Rightslink site.

