

Brevemente para situar nuestro trabajo transcribimos literalmente la hipótesis y objetivos que se propusieron para el proyecto “Nuevas Estrategias Terapéuticas para sPNET”

HIPÓTESIS

El manejo terapéutico de los tumores cerebrales infantiles de alto grado y específicamente los sPNET es subóptimo y se requieren nuevas estrategias terapéuticas que sean más efectivas pero que también tengan unos efectos secundarios asumibles. Los tratamientos actuales dejan unas secuelas cognitivas y hormonales devastadoras para estos niños que las hacen inaceptables sobre todo para los grupos de los menores de 2 años. El objetivo a largo plazo de nuestro laboratorio es mejorar la supervivencia y la calidad de vida de niños con tumores cerebrales de alto grado y específicamente con sPNET. El objetivo concreto de este proyecto es por un lado generar herramientas que permitan el estudio de estos tumores tanto a nivel genómico como biológico y de aplicaciones terapéuticas diseñadas específicamente para ellos. Por otro lado es evaluar la eficacia antitumoral del virus Delta-24-RGD. Nuestra racional se basa en que nuestro grupo ya ha demostrado la seguridad de este agente en la clínica y en algunos pacientes beneficio clínico. Esperamos poder generar evidencia preclínicas sólidas que nos permitan realizar un ensayo clínico en sPNETs.

Hipotetizamos que el Delta-24-RGD puede constituir una alternativa al abordaje terapéutico de los sPNET. Esta terapia nos permitirá reducir la dosis de quimioterapia y/o evitar la radioterapia por la tanto resultando en una mejora significativa del pronóstico y calidad de vida de los niños con sPNET.

Objetivos específicos:

Contrastaremos la hipótesis de central de este proyecto e intentaremos alcanzar el objetivo final de esta aplicación mediante los siguientes objetivos:

Objetivo 1. Generar líneas celulares a partir de tejidos obtenidos de pacientes que presenten sPNET y desarrollar modelos murinos relevantes que permitan el estudio de la enfermedad.

Existen muy pocas líneas celulares y modelos murinos relevantes que permitan estudiar este tipo de tumores. Por ello un objetivo muy importante es generar las herramientas necesarias que nos permitan llevar a cabo tanto estudios de la biología del tumor como estudios de búsqueda de nuevas terapias.

Objetivo 2. Evaluar el efecto antitumoral como agente único del Delta-24-RGD in vitro e in vivo. Hipotetizamos que el Delta-24-RGD administrado localmente en el tumor demostrará tener un efecto antitumoral significativo en los sPNET ya que presentan aberraciones en la ruta del RB. Para

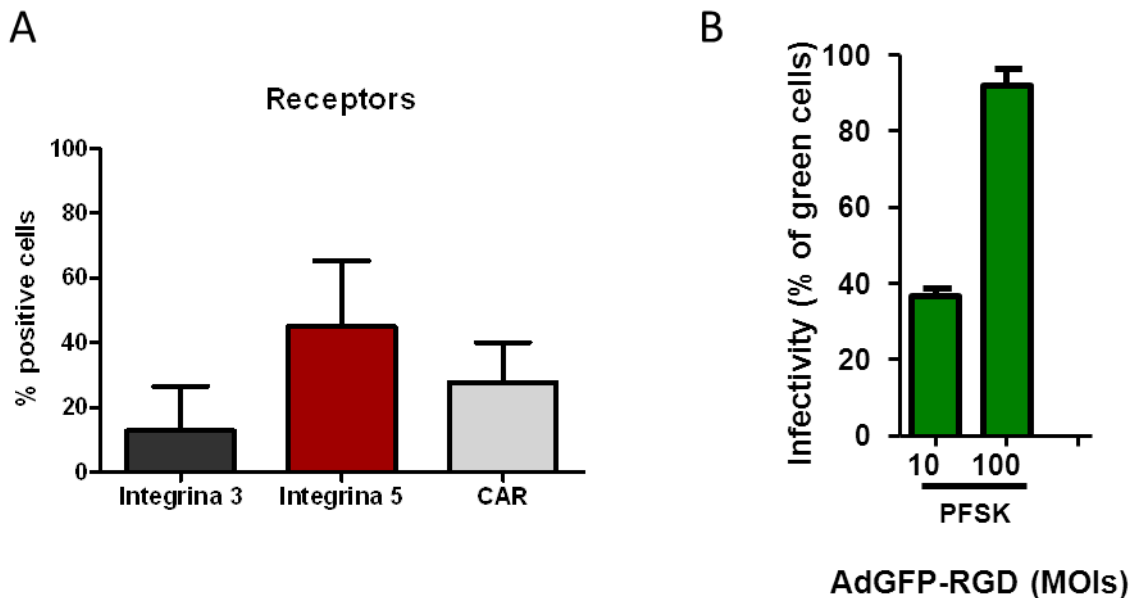
responder a esta pregunta realizaremos estudios in vivo e in vitro utilizando líneas establecidas comerciales y las establecidas en el objetivo 1.

Resultados

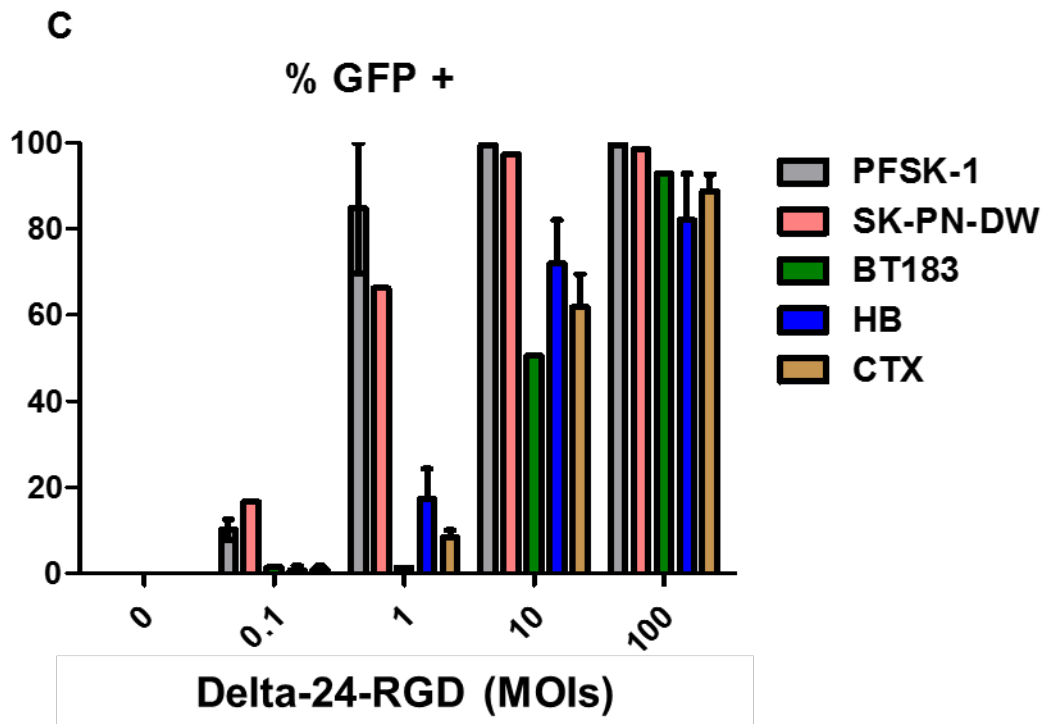
Durante la primera fase del proyecto intentamos establecer las herramientas para poder trabajar en estos tumores. Existen muy pocas células y modelos animales para estudiar esta enfermedad. A día de hoy ya hemos conseguido 4 líneas; 2 comerciales y 2 proporcionadas por colaboradores de otros centros BT183 (Dr. Jennifer Chan; Canada) y HB (Dr. Eric Raabe, John Hopkins, Baltimore). También generamos una línea en nuestro centro, PTB25, derivada de la biopsia de un niño de 3 años con un ETMR (nueva nomenclatura según la WHO). Este niño acudió a nuestro centro para vacunación con células dendríticas, ensayo que estaba en ese momento abierto. Sin embargo, aunque logramos realizar algunos experimentos in vitro la línea acabó parándose y murió.

A continuación, haremos un resumen de los resultados conseguidos hasta ahora.

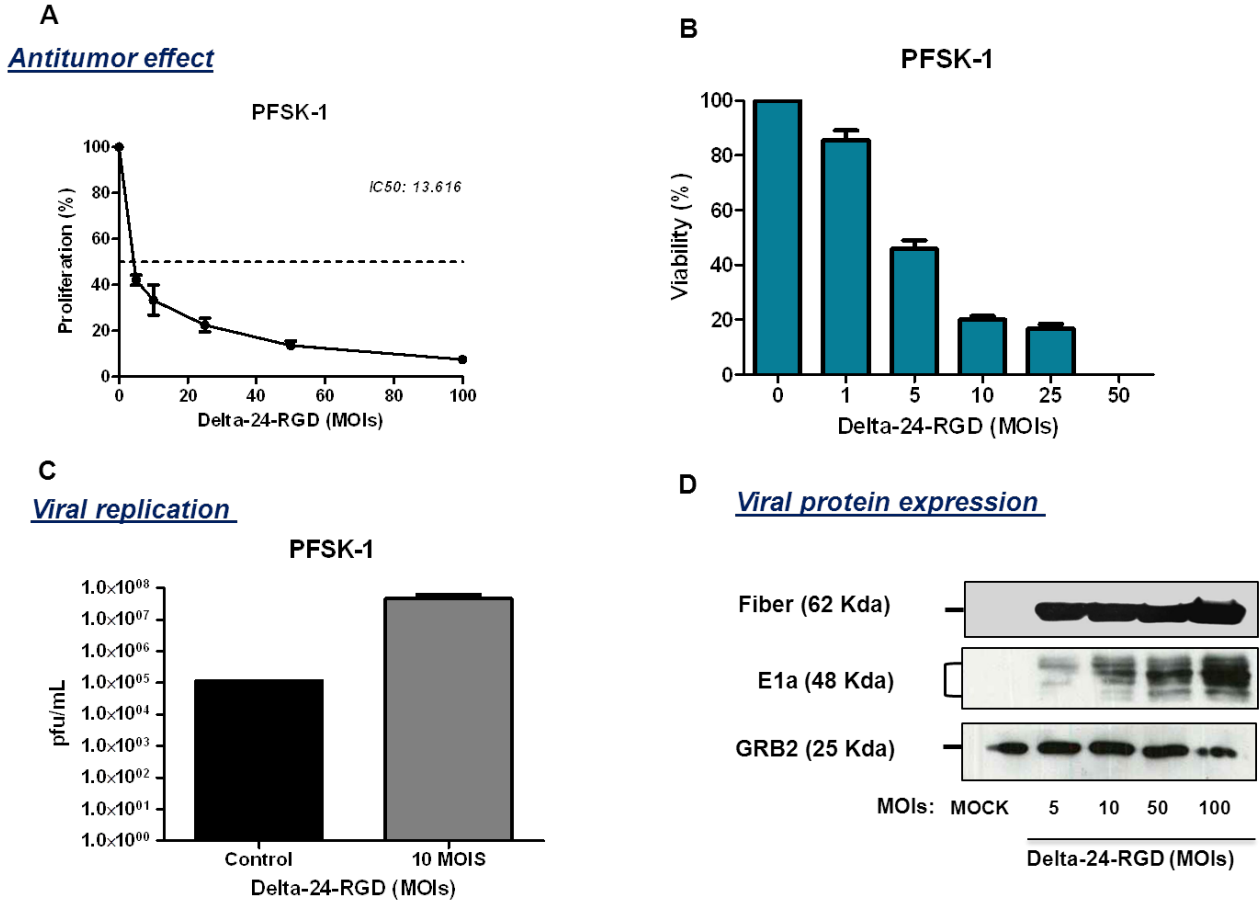
Primeramente se procedió a analizar los receptores a través de los cuales el virus infecta para poder evaluar si estas células son susceptibles a la infección viral y por tanto a su efecto. Específicamente CAR (coxsackie adenovirus receptor; que es el receptor nativo del virus) y las integrinas α - β 3 y α - β 5 (Figure 1A)



Observamos que esta línea expresaba tanto integrinas como CAR a diferentes niveles siendo la integrina 5 la más abundante. Seguidamente utilizando un virus no replicativo que expresa la proteína fluorescente GFP analizamos la capacidad de infectar del virus (Figura 1B). Observamos que a 10 MOIs (10 unidades de virus por cada célula) el virus era capaz de infectar alrededor del 40% de las células. Mientras que a 100 MOIs prácticamente el 100% de la población estaba infectada. Además, como ahora contamos con líneas adicionales de PNET extendimos el análisis de infectividad a estas líneas. Las cuales se infectaron a diferentes concentraciones de un virus que expresa GFP y se cuantificó mediante citometría de flujo (Figura 1C) Estos datos sugieren que realmente el virus es capaz de infectar de manera eficaz estas líneas de PNETs.

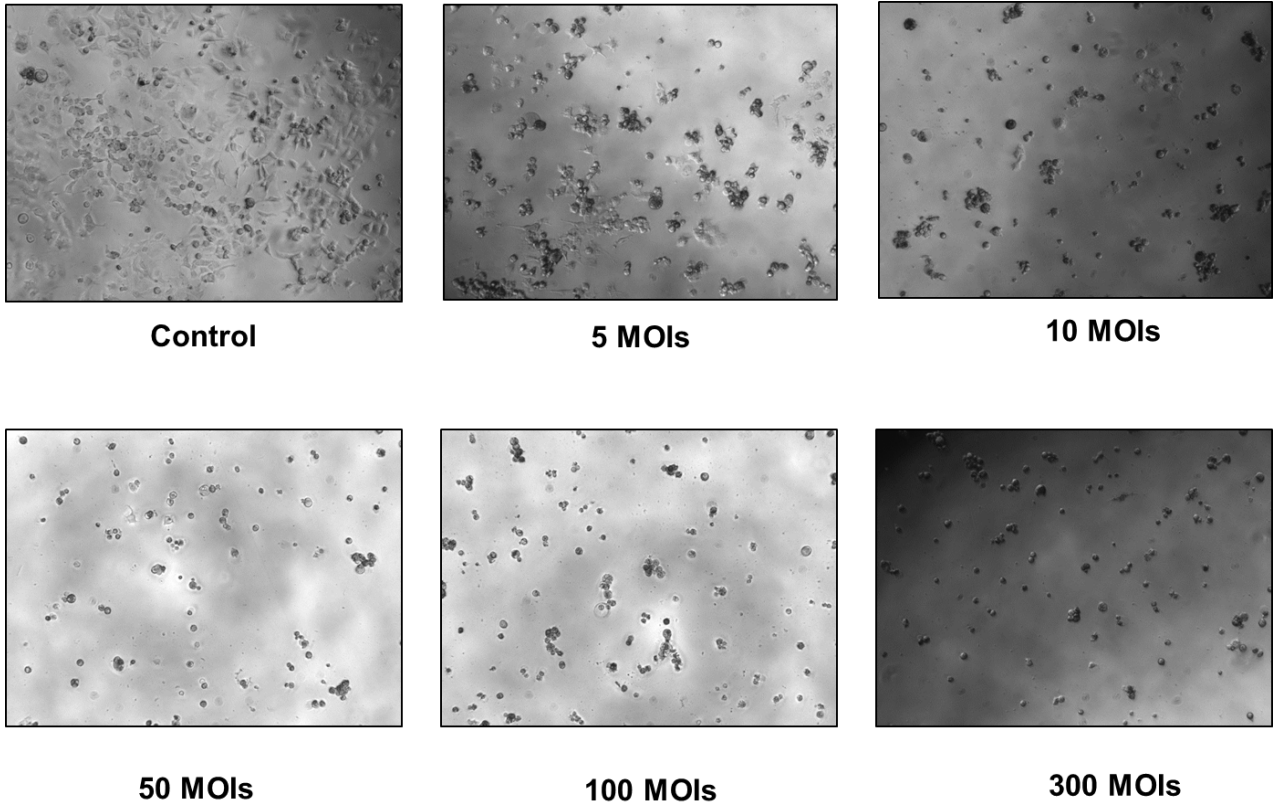


Seguidamente pasamos a evaluar el efecto antitumoral del virus en la línea PFSK para ello analizamos tanto el efecto del Delta-24-RGD en la proliferación (Figura 2A) como en la viabilidad (Figura 2B).

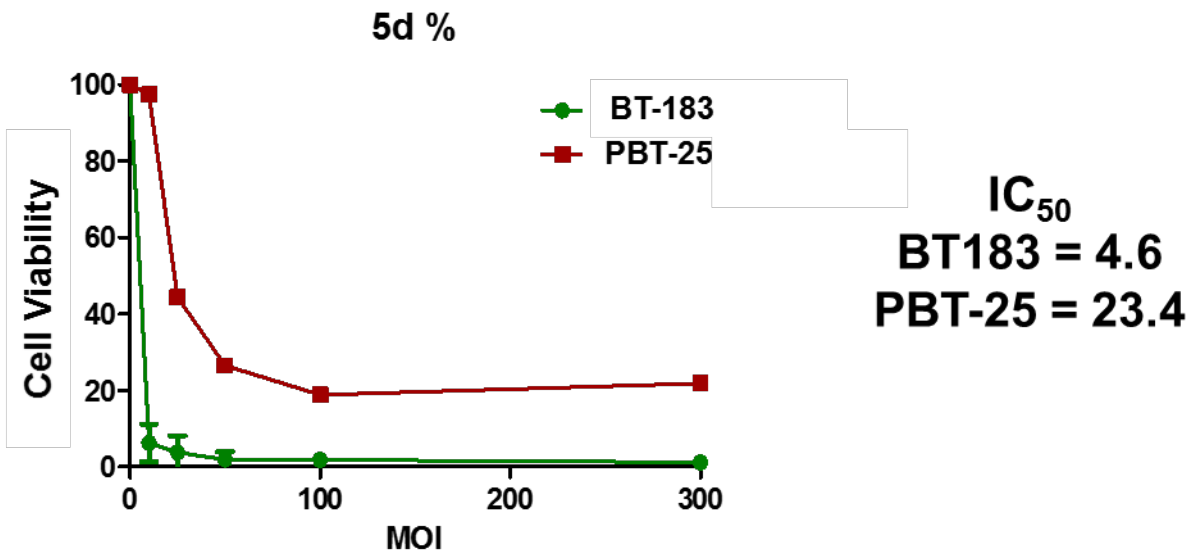


Como se puede observar el virus demostró tener un efecto antitumoral dosis dependiente en la línea PFSK con un $IC_{50} = 13.6$ MOIs. Estos resultados son bastante prometedores. Seguidamente analizamos la replicación viral mediante un ensayo funcional donde se miden partículas virales (Figura 2C) y observamos que a 10 MOIs a 48hrs tenemos tres logaritmos de virus más que el control inoculado. Por último analizamos la expresión de proteínas virales relevantes tales como la Fibra y la E1A (Figura 2D). De nuevo observamos que el virus es capaz de expresar proteínas virales clave en la línea PFSK.

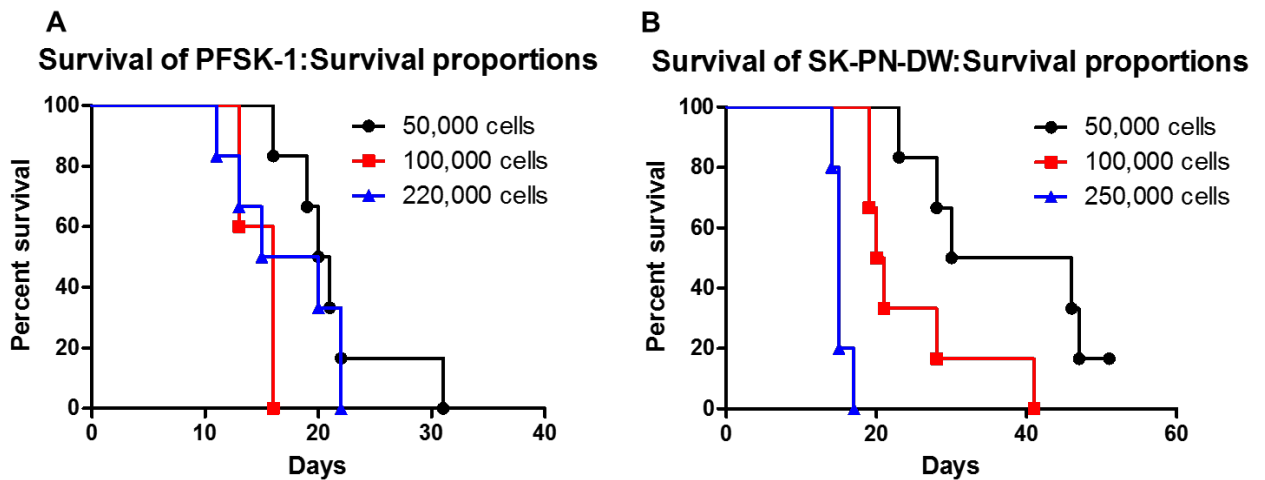
En la Figura 3 se puede observar la morfología de las células PFSK tratadas con el virus a concentraciones crecientes. Como reflejan las micrografías el efecto antitumoral del virus puede observarse incluso a concentraciones bajas como 5 MOIs.



Hemos evaluado la citotoxicidad en las líneas BT183 y PBT-25 (Figura 3). Podemos observar que ambas líneas eran susceptibles a ser matadas con el virus. Siendo las IC₅₀ de 4.6 MOIs para la BT183 y 23.4 MOIs para la PBT-25. Este experimento se llevó a cabo 5 días después de la infección.



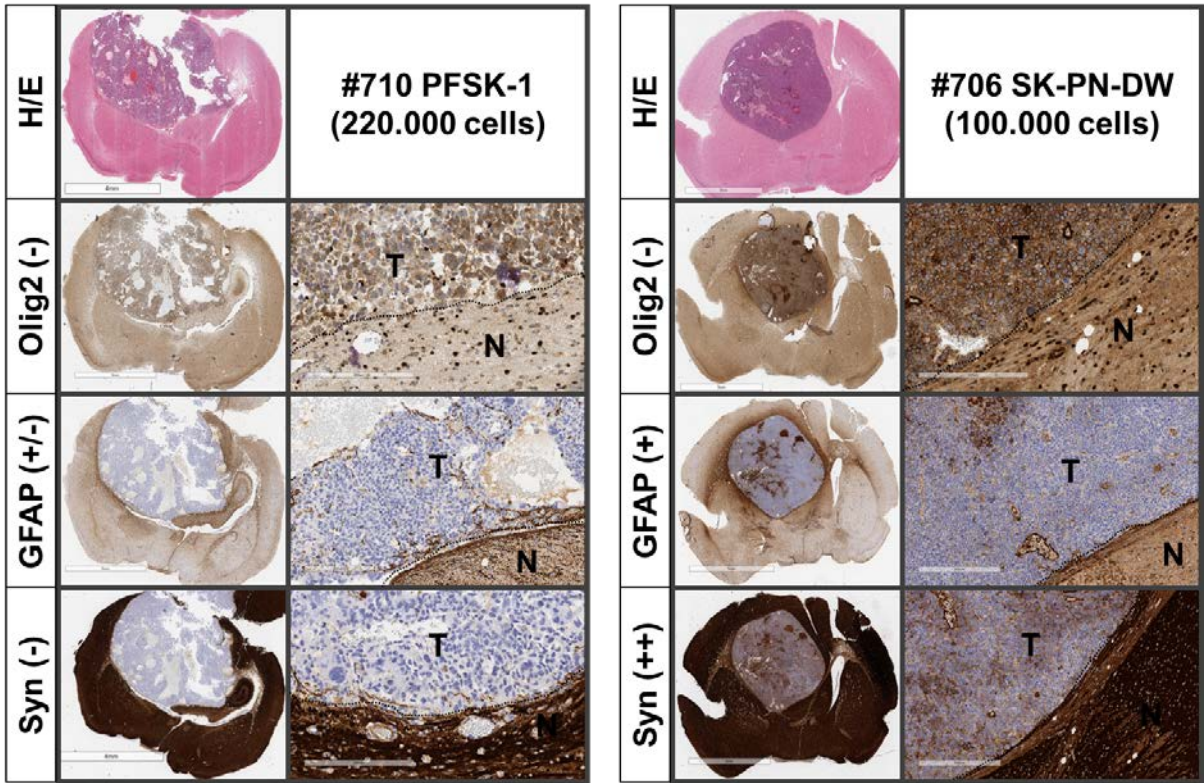
Hemos realizado los experimentos de tumorigenicidad in vivo con las líneas PFSK y la SK-PN-DW. Para ello se han implantado diferente número de células intracranialmente a ratones desnudos (N=6 por grupo). Hemos visto que las células anidan en todos los ratones. Además para el día 16 todos los ratones ya han sido sacrificados porque mostraban síntomas asociados con el desarrollo de tumor (tales como parexia, inestabilidad, combulsiones etc). En la Figura 4 hemos representado la curva de supervivencia de estos ratones. Para la línea celular PFSK trabajaremos con la concentración de 220.000 células y para la SK-PN-DW utilizaremos la concentración de 100.00. Estas concentraciones nos dan una ventana de unos 20 y 30 días respectivamente para evaluar el efecto antitumoral del virus.



El experimento con la BT183 y la HB está en marcha y terminará en las próximas semanas.

Del experimento anterior se realizó un análisis de histología para caracterizar los marcadores que expresaban estos tumores. Para ello se extrajo el cerebro y se incluyeron en parafina. Se realizó una tinción de Hematoxilina-Eosina (H/E). Que nos permite ver las características anatomopatológicas del tumor. Además se evaluó la expresión de marcadores como GFAP, Olig2 y Sinatofisina (syn) (Figura 5)

Marcadores Histología



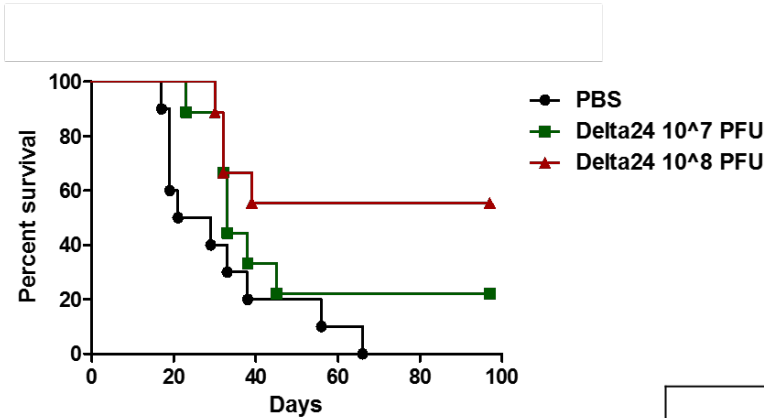
Por último, evaluamos el efecto antitumoral del Delta-24-RGD en los modelos de PFSK y BT183.

En este experimento a día 0 se implantan los tumores en el cerebro de los ratones. En el día tres se comienzan a tratar intratumoralmente mediante una inyección de virus dos dosis diferentes (10^7 y 10^8 pfu; virus funcionales) o con PBS (tampón que nos sirve de control). Observamos que ambas dosis de virus son capaces de alargar la vida media de los ratones significativamente cuando se comparaban con el control (tratado con PBS). Importante destacar que en la dosis más alta (10^8 pfu) no se alcanzó la media ya que más del 50% de ratones eran supervivientes de largo tiempo. Ambas dosis dieron lugar a ratones que al final del experimento no presentaban tumor (Figura 6). En estos momentos estamos terminando el experimento con la línea celular BT183 también con datos prometedores y empezando con la línea HB.

Estos datos sugieren que el Delta-24-RGD podría ser una estrategia interesante para el tratamiento de los PNETs y que podría complementar a los tratamientos estándar que ya existen.

Delta-24-RGD en PFSK-1

- Ratones Nude, 4-6 semanas (10 ratones por grupo)
- PFSK, 5uL, día 0
- 10^7 y 10^8 PFU Delta-24-RGD, 3uL, 1 administraciónes (a día 3)



	Median survival (days)
PBS	25
Delta24 10 ⁷ PFU	33
Delta24 10 ⁸ PFU	-
P value	0.0215

Por último, cerrar esta memoria que aunque no lo recogemos como un resultado gráfico gracias a la ayuda prestada por Fuerza Julen el Dr. Marc García-Moure realizó una estancia en el laboratorio de la Dra. Renata Stripecke en la Universidad de Hannover, Alemania. La Dra. Stripecke es líder en el campo de las enfermedades infecciosas con un gran bagaje en el desarrollo de ratones inmunocompetentes humanizados. El efecto antitumoral del virus está mediado por la respuesta del sistema inmune y en los modelos actuales que utilizamos nos perdemos esa respuesta. Como no existen modelos murinos inmunocompetentes de PNETs la idea sería utilizar estos modelos humanizados donde utilizaremos el tumor de pacientes y su sangre periférica para humanizar al ratón. Las células de la sangre periférica recapitularían, en parte y con limitaciones obviamente, el sistema inmune del paciente. Esta herramienta sería muy útil para evaluar la respuesta frente al virus.

Este trabajo se ha presentado en varios congresos de los cuales quiero destacar el congreso bianual que realiza la Sociedad de NeuroOncología de la rama pediátrica que se celebró en Nueva York en Junio del 2017 y donde fue elegido como una plataforma oral.

Pediatric Neuro-Oncology Basic and Translational Research Conference; New York city. 15-17th June 2017.

The oncolytic adenovirus Delta-24-RGD mediates an efficient antitumor response in vivo in supratentorial primitive neuroectodermal tumors

Marc Garcia-Moure, Naiara Martínez-Vélez, Marisol Gonzalez-Huarriz, Montserrat Puigdelloses, Ana Patiño García, Miguel Ángel Idoate, Ricardo Diéz-Valle, Sonia Tejada, Cande Gomez-Manzano, Juan Fueyo and Marta M Alonso.

Finalmente concluir que realmente el ensayo está muy cerca y que ahora mismo estamos pidiendo financiación para el mismo a convocatorias competitivas. Ya concurrimos a un proyecto europeo, pero desgraciadamente no lo conseguimos. Vamos a aplicar este verano a una beca americana para financiar el ensayo en colaboración con el Baylor-Texas Children's de Houston

En resumen, en base a los datos que hemos obtenido pensamos que esta estrategia merece la pena.

