

Reovirus, Adyuvante en Células Neoplásicas Ras-activadas y Refractarias al Tratamiento.

Reovirus, Adjuvant in Ras-activated Neoplastic Cells and Treatment-Refractory.

Juan C. Ruiz-Cabezas ¹
 Ángel R. Rivera-Castro ²

¹ Médico - Biólogo Molecular, Laboratorio Clínico y Molecular Hospital "Dr. Juan Tanca Marengo" de la Sociedad de Lucha contra el Cáncer - SOLCA, Matriz Guayaquil.

² Estudiante 9no Ciclo, Universidad Católica de Santiago de Guayaquil Carrera de Medicina, Guayaquil, Ecuador.

RESUMEN

Los reovirus son relevantes en la terapia oncológica actual gracias a su capacidad lítica en células Ras-activadas. Se revisaron documentos expuestos en las reuniones de ASCO y Oncolytics, así como publicaciones disponibles en la base de datos de Clinical Cancer Research. Estudios preclínicos han revelado la asociación de Ras-GTP a tumores humanos, y la susceptibilidad de células neoplásicas *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*. Tres ensayos clínicos de Fase II demostraron la seguridad, eficacia y tolerabilidad en el uso de Reovirus. La combinación Reovirus-Radioterapia, a bajas y altas dosis, aumenta sinérgicamente la citotoxicidad en tumores metastásicos con un control de la enfermedad del 93%. La combinación Reolysin-Paclitaxel-Carboplatino en cáncer de cabeza y cuello ha justificado el avance a Fase III. Debido a la elevada tasa de mortalidad relacionada a metástasis, la biodisponibilidad de Reovirus vía intravenosa debe ser mejorada a través del precondicionamiento del huésped inmunocompetente con depleción Treg.

Palabras Clave: Adyuvant; Células Ras-activadas; Reolysin; Reovirus.

ABSTRACT

Reoviruses are relevant in current cancer therapy through its lytic capacity in Ras-activated cells. We reviewed scientific material presented in the meetings of ASCO and Oncolytics, as well as publications available in the Clinical Cancer Research database. Preclinical studies have revealed the association of Ras-GTP in human tumors, and neoplastic cell susceptibility *in vitro*, *in vivo* and *ex vivo*. Three clinical trials of Phase II demonstrated the safety, efficacy, and tolerability in the use of Reovirus. The Reovirus-radiotherapy combination, at low and high doses, increases synergistically the cytotoxicity in metastatic tumors, with a disease control of 93%. The Reolysin-Paclitaxel-Carboplatin combination in head and neck cancer has justified the progression to Phase III. Due to the high death rate related to metastasis, the bioavailability of intravenous Reovirus must be improved through the preconditioning of the immunocompetent host with Treg depletion.

Key words: Adjuvant; Ras-activated cells; Reolysin; Reovirus.

INTRODUCCIÓN

Los reovirus poseen un genoma de 10 segmentos de ARN bicatenario, son icosaédricos, pequeños, no envueltos. ^(1,2,3) Denominados virus oncolíticos, son autorreplicantes y tumor-selectivos. ^(2,4-9)

Frecuentemente aislados del aparato respiratorio y gastrointestinal, los reovirus son considerados benignos. ^(4,5,6) Sólo generan infección lítica en células que posean la proteína Ras activada (Ras-GTP) ^(1-6,8,9) por mutación directa y por sobreexpresión o transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). ⁽¹⁰⁾

Recibido 03/12/10; Revisado 12/12/10; Aceptado 02/01/11.
 Correspondencia: Juan Carlos Ruiz Cabezas.
 Laboratorio Clínico y Molecular Hospital "Dr. Juan Tanca Marengo" de la Sociedad de Lucha contra el Cáncer - SOLCA, Matriz Guayaquil. Telf: 593-4-2288088 ext: 143-144.
 E-mail: jrui@solca.med.ec
 © 2011 Programa Publicaciones Médicas Pregrado.
 © 2011 Revista MedPre.

Los reovirus representan una terapia oncolítica debido a que el 30%-40% de todos los tumores poseen Ras-GTP^(2,3,4), siendo prevalentes en cáncer pancreático, colorrectal, tiroideo, pulmonar, ovárico, leucemia mieloide y meduloblastoma.^(4,5)

Para muchos tumores la radioterapia es curativa, ya sea como agente único o en combinación con quimioterapia radiosensibilizante. Para otro tipo de tumores, la radioterapia es adyuvante después de la resección quirúrgica. Recientemente se ha determinado que la resistencia y el fracaso en la radioterapia están relacionados a sobreexpresión del EGFR y a la fosforilación de la proteína quinasa B (Akt).⁽³⁾

Esta revisión detalla la prevalencia de Ras-GTP en tumores humanos, las bases moleculares de la terapia oncolítica con reovirus, los resultados de ensayos preclínicos y clínicos, así como su eficacia adyuvante en quimio-radioterapia, a fin de proveer al personal médico una referencia objetiva de las ventajas de la Terapia Oncolítica Reoviral.

METODOLOGÍA

La selección de información se realizó en base a los referentes probados más representativos a nivel mundial, a partir de fuentes primarias u originales, esto incluye reuniones del American Society of Clinical Oncology – ASCO, conferencias dictadas por Oncolytics, y publicaciones en revistas científicas obtenidas a través de la base de datos de Clinical Cancer Research, EMBO Journals, PNAS, Molecular Cancer Therapy, Journal of Immunology, y Journal of Clinical Oncology, relacionadas al tema objeto de esta revisión.

Los términos de búsqueda utilizados fueron: Reovirus, Reolysin y Oncolytics. Se excluyeron artículos de revisión e investigaciones realizadas con otros tipos de virus oncolíticos.

Se analizaron artículos originales publicados en la última década y estudios anteriores dada su relevancia científica en concordancia con el desarrollo de la terapia oncolítica mediante reovirus, incluyendo publicaciones que detallan las vías moleculares implicadas en el proceso de infección viral, así como estudios que evidencian la eficacia del tratamiento reoviral en modelos animales y ensayos clínicos en humanos de manera única y en combinación con quimioterapia o radioterapia.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Prevalencia de Ras-GTP en tumores humanos

Existen diferencias en cuanto a la expresión prenatal y posnatal de los genes ras, y en ciertos tejidos adultos se expresan preferentemente uno u otro miembro de la familia. En particular, las mutaciones del gen K-ras se encuentran en el 80%-90% de cánceres pancreáticos, en 40%-50% de carcinomas colorrectales, en 25-40% de seminomas, y en 18-30% de neoplasias hematopoyéticas de origen mieloide (K- y N-ras). Hasta 60% de cánceres de vesícula biliar poseen activación Ras, 50% de tumores tiroideos, hasta 48% de cánceres de ovario, 24% de cánceres de pulmón, y 30-50% en cáncer de piel no melanoma (H-ras); en otros tumores, un gen ras mutante se encuentra en una frecuencia más baja: por ejemplo, en el carcinoma de mama (0-12%, K-ras), glioblastoma y neuroblastoma (0 - 10%, K- y N-ras).^(1,3,4)

Adicionalmente, el 90% tanto de cánceres pulmonares de células no pequeñas (NSCLC) como de cabeza y cuello poseen sobreexpresión de EGFR, el 25%-30% de cánceres mamarios posee incremento de c-ErbB2 y en glioblastomas del receptor-b del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR-b) y/o del EGFR.⁽³⁾

Bases moleculares de la Terapia Oncolítica Reoviral

Los reovirus humanos poseen como receptor celular el ácido siálico, un hecho que les permite unirse a la mayoría de las células de mamíferos. Sin embargo, ni la unión ni la internalización del virus asegura un resultado productivo.⁽⁷⁾

Se han definido tres serotipos de reovirus (tipo 1 Lang; tipo 2 Jones; tipo 3 Abney, y tipo 3 Dearing) en base a su neutralización por anticuerpos y su actividad inhibitoria hemaglutinante.⁽³⁾

Las células normales y las neoplásicas manifiestan diferentes niveles de sensibilidad a la infección reoviral. Preferentemente infecta y lisa las células tumorales con Ras-GTP adquirido por mutaciones activadoras del Ras, o por alteraciones de los elementos anterógrados o retrógrados de su vía de activación, tales como sobreexpresión del EGFR, del PDGFR-b, y del c-ErbB2, así como activación de Src, Sos-1 (son of sevenless homolog 1), Sos-2 (son of sevenless homolog 2), entre otros.^(2,3,7)

Las células no transformadas son relativamente resistentes a la infección reoviral. (2-4,6,8,9) En respuesta a las infecciones virales el huésped utiliza para su defensa la apoptosis; sin embargo, los virus poseen la capacidad de bloquearla. En la apoptosis innata el bloqueo ocurre a tres niveles: activación de PKR, inhibición de la alteración de la membrana mitocondrial, e inactivación de p53. (7)

**Resistencia a la infección Reoviral:
Activación de PKR.**

Tanto en las células no transformadas (reovirus-resistentes) y EGFR-, Sos-, o Ras- transformadas (reovirus sensibles), se procede normalmente a la unión reoviral, internalización, pérdida de la envoltura y a la transcripción temprana de los genes virales. En el caso de las células no transformadas, las estructuras secundarias en la transcripción viral temprana inevitablemente desencadenan la activación de PKR citosólica, permitiendo la fosforilación del factor de iniciación de la traducción (eIF-2 α), el cual provoca el

detenimiento del ciclo celular y la inhibición de la traducción de genes virales, así como la síntesis de óxido nítrico mediado por el factor de transcripción nuclear Kappa B (NF- κ B). (7) En el caso de las células EGFR-, Sos-, o Ras- transformadas, la fosforilación de PKR es prevenida o revertida por Ras o uno de sus elementos intermedios, lo que permite la traducción de genes virales. La acción de Ras (o un elemento intermedio) para promover la traducción de genes virales (y por lo tanto, la infección por reovirus) en las células no transformadas pueden ser imitadas por la eliminación del gen Pkr o bloqueando la fosforilación de PKR con 2-aminiopurina (2-AP). (9) (Fig. 1)

El aumento de PKR y óxido nítrico reduce la actividad de las células Natural Killer (NK) y de los linfocitos T, evitando la destrucción de las células sanas infectadas con reovirus. Además, se ha reportado que las NK son altamente citotóxicas contra ErbB2 expresado en células cancerosas sin afectar a células normales. (1)

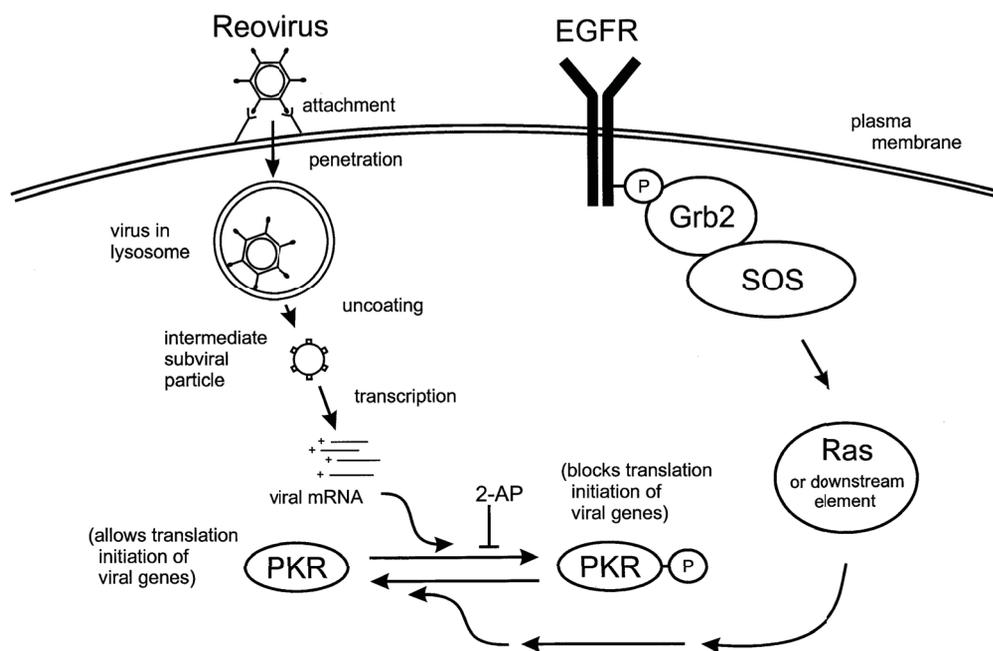


Fig. 1. Base molecular de la oncólisis reoviral: Usurpación de la vía de señalización Ras en la célula huésped.
Fuente: Strong et al. The molecular basis of viral oncolysis. EMBO Journal, 1998.

**Susceptibilidad a la Oncólisis Reoviral:
Vía Ras/RalGEF/p38.**

La replicación reoviral en células Ras-transformadas depende de la señalización RalGEF. Las otras dos vías señalizadoras posteriores al Ras (Raf y PI3K) no parecen estar involucradas en este proceso. Esta aseveración está

respaldada por el uso de mutantes del dominio efector Ras, que revelaron una preferencia a los reovirus en la línea celular que expresa el mutante RasV12G37 (RalGEF+, no-Raf, no-PI3K) sobre las líneas celulares con RasV12C40 (PI3K +, no-RalGEF, no-Raf) y RasV12S35 (Raf +, no-PI3K, no-RalGEF). (2) (Fig. 2)

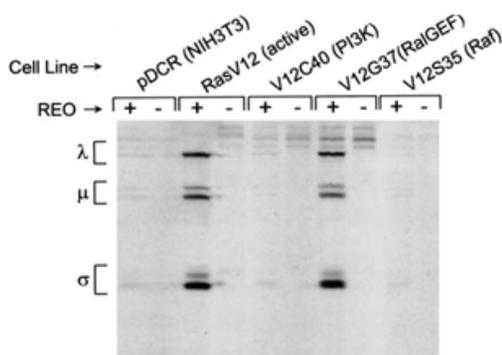


Fig. 2. Vías efectoras Ras en la susceptibilidad reoviral. Infección de fibroblastos embrionarios de ratón (NIH-3T3) con mutaciones en las vías Ras, PI3K, RalGEF y Raf.

Fuente: Norman et al. Reovirus oncolysis: The Ras/Ral/GEF/p38 pathway. PNAS, 2004.

Ras y RalGEF han sido implicados en la activación de la proteína quinasa activada por estrés, p38. El tratamiento de células susceptibles con el inhibidor p38, SB203580, bloquea potentemente la infección reoviral. La activación p38 ha sido reportada en NSCLC y pólipos colónicos, así como en la progresión folicular a difusa del linfoma B de célula grande.⁽²⁾

RalA se requiere para la proliferación de anclaje-independiente de las células transformadas; por el contrario, RalB es indispensable para prevenir que las células transformadas inicien la apoptosis. De esta manera, las isoformas Ral colaboran en el mantenimiento de la transformación oncogénica mediante la proliferación tumoral y señales de supervivencia.⁽¹¹⁾

Aumento de la actividad antitumoral: Natural Killer.

Generalmente la biodisponibilidad de los reovirus está disminuida por los anticuerpos antireovirales. En el estudio preclínico realizado por Kottke y cols. en 2009 se demostró que el preconditionamiento del huésped murino con la depleción de linfocitos T reguladores (Treg) e IL-2 aumenta la localización de reovirus en tumores establecidos al ser administrados por vía intravenosa (i.v.). La IL-2 expande la actividad (por depleción de Treg) de las NK, lo que promueve el aumento de la replicación, difusión, y oncolisis reoviral. Además, IL-2 es capaz de inducir el síndrome de fuga capilar, lo que aumenta la biodisponibilidad de los reovirus hacia el tejido neoplásico. Por otra parte, la ciclofosfamida (CPA) puede imitar los efectos funcionales del inhibidor de Treg (PC-61).⁽⁶⁾

La interacción de las células dendríticas (DC) en la actividad antitumoral de las células NK ha sido identificada como reclutadora, activadora y potenciadora contacto-dependiente con la capacidad de inducir la citotoxicidad hacia las células tumorales. En el estudio de Prestwich y cols. en 2009 se demostró que las DC inducen la producción de IFN- γ con el subsecuente incremento de la población NK e induce su quimiotaxis a través de las quimiocinas CCL2, 3, 4, 5, 7, 8, 11, y CXCL10.⁽¹²⁾

Resultados de los Ensayos Preclínicos con Reovirus

Los ensayos preclínicos son todas aquellas pruebas tendientes a comprobar las características de una sustancia, su posible toxicidad y la eficacia terapéutica en animales que justifiquen su pase a experimentación en seres humanos. La actividad antitumoral se detecta en sistemas animales y en sistemas in vitro.

Verificación de la sobreexpresión de EGFR.

Inicialmente fue necesaria la comprobación de la expresión del EGFR en varios tipos de tumores humanos.^(1,4) El estudio más representativo, ejecutado por Wu y cols. en 2007, utilizó una línea celular de adenocarcinoma de pulmón metastásico (NCI-H441), y una variante de la línea celular de adenocarcinoma pulmonar (PC14-PE6). Los resultados del ensayo demostraron que NCL-H441 expresaba altos niveles de EGF/TGF- α (ligandos de EGFR), lo que se traduce en mayor activación del EGFR (pEGFR), mientras que en PC14-PE6 se encontraron niveles bajos o indetectables de EGF/TGF- α , es decir, expresión de EGFR pero no pEGFR.⁽¹⁰⁾ (Fig. 3)

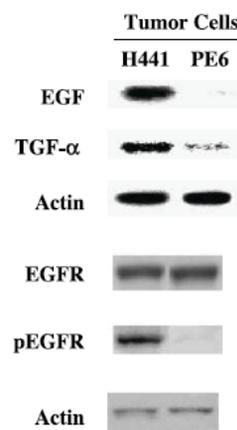


Fig. 3. Expresión de EGFR y sus ligandos en células tumorales NCI-H441 y PC14-PE6 in vitro.

Fuente: Wu et al. Expression of epidermal growth factor. Mol Cancer Ther, 2007.

Los hallazgos se obtuvieron de cortes histológicos de pulmón de ratón en los que se trasplantó NCI-H441, PC14-PE6 y de tejido pulmonar adyacente libre de tumor en los que se determinaron los niveles de EGF/TGF- α por PCR de transcripción inversa. Los niveles de expresión de EGFR y pEGFR se determinaron por Western Blot, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia doble. La fluorescencia roja fue utilizada para identificar las células endoteliales (CD31) y la fluorescencia verde se empleó para identificar EGFR o pEGFR. La fluorescencia amarilla indica expresión celular endotelial (EGFR/CD31) o activación (pEGFR/CD31) de EGFR. ⁽¹⁰⁾(Fig. 4)

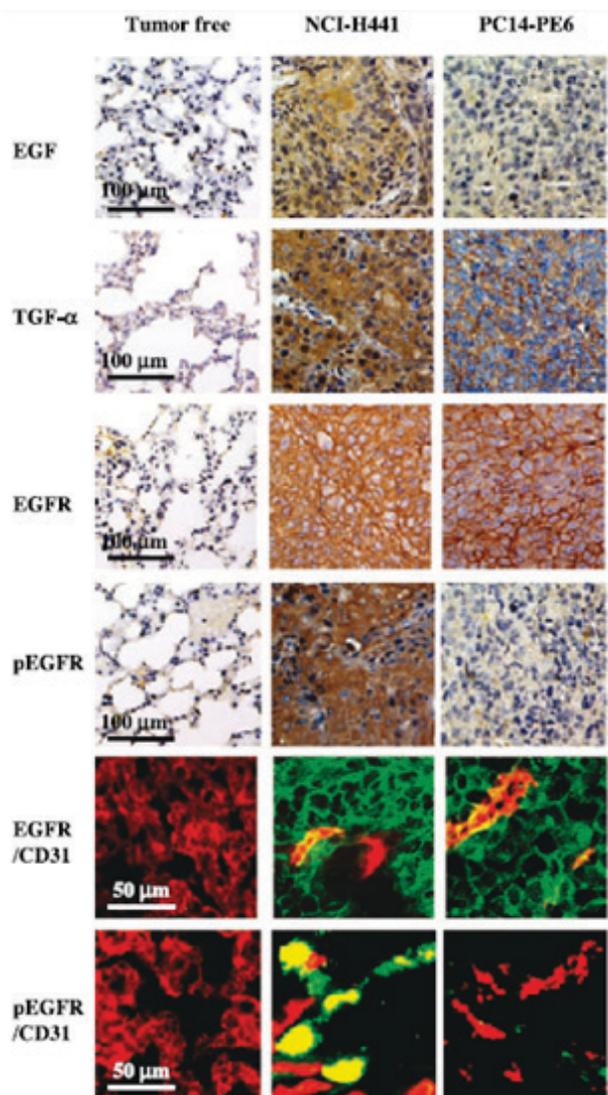


Fig. 4. Expresión de EGFR, pEGFR, EGF y TGF- α en imágenes inmunohistoquímicas de de las secciones de tejido tumoral de pulmón.

Fuente: Wu et al. Expression of epidermal growth factor. Mol Cancer Ther, 2007.

Comprobación de la susceptibilidad de las células SOS-activada y Ras-activada a Reovirus.

Para evidenciar la susceptibilidad de las células transformadas a la infección reoviral se utilizaron líneas celulares de meduloblastoma ⁽⁵⁾, cáncer pancreático ⁽¹⁾, cáncer de colon, de ovario ⁽⁴⁾, entre otras. El ensayo más probatorio fue realizado por Strong y cols. en el cual se utilizó fibroblastos embrionarios de ratón (NIH-3T3), NIH-3T3 con transfecciones de los oncogenes H-ras y EJ-ras, y una cuarta línea correspondiente a NIH-3T3 a la que se le agregó transfección Sos (TNIH3#5). ⁽⁷⁾

Las células NIH-3T3 poseen resistencia a la infección reoviral por ausencia de sobreexpresión EGFR, mientras que las mismas células transformadas con erbB-v o EGFR son altamente susceptibles según lo determinado por el efecto citopático, la síntesis de proteínas virales y la producción del virus. Las cuatro líneas celulares fueron infectadas con Reovirus tipo 3 Dearing a una multiplicidad de infección (MOI) de 10 unidades formadoras de placas (p.f.u.) por célula, y comparadas en términos de su capacidad para promover la síntesis de proteínas virales. Se denomina MOI a la razón entre la cantidad de virus en el inóculo y la cantidad de células en el cultivo. Así por ejemplo, una MOI equivalente a 1 significa que cada célula en la monocapa puede ser infectada teóricamente por una partícula viral. ⁽⁷⁾

A las 48 horas post-infección las células fueron fijadas, procesadas, y reaccionaron con anti-reovirus 3 de conejo y luego con IgG de cabra contra conejo, ambas conjugadas con fluoresceína isotiocianato (FITC). La detección de proteínas virales se llevó a cabo inicialmente por inmunofluorescencia indirecta. Al comparar las líneas parentales no infectadas con las diversas líneas celulares transformadas fue evidente que la morfología de las células era muy distinta a la transformación. Considerando que las células NIH-3T3 adoptaron una forma típica aplanada, morfología extendida y con una marcada inhibición por contacto, las células transformadas crecieron a menudo en forma de huso y con la inhibición por contacto muy reducida, lo cual es característico de células tumorales. ⁽⁷⁾

El desafío con reovirus quedó demostrado por una infección del 5% en la línea parental NIH-3T3. Este pequeño porcentaje de infectividad se atribuye al hecho de que NIH-3T3 a veces puede sufrir una transformación espontánea. En contraste, las líneas celulares transformadas con Sos o Ras demostraron una inmunofluorescencia relativamente pronunciada a las 48 horas después de la infección. ⁽⁷⁾ (Fig. 5)

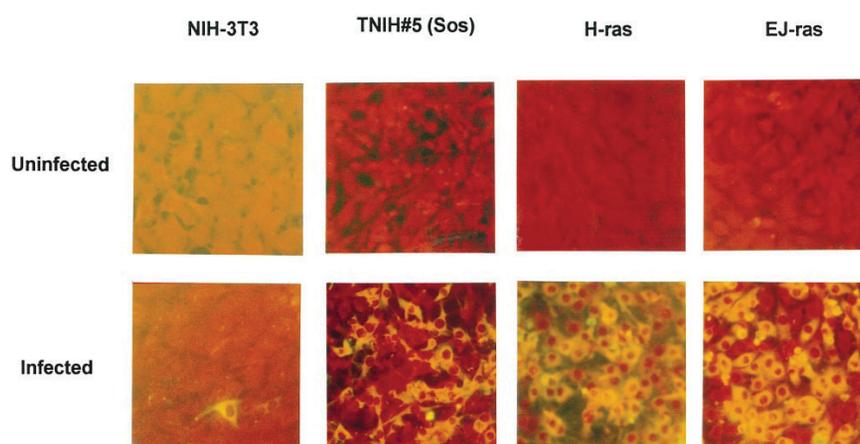


Fig. 5. Efecto de Sos-activado y Ras-activado en la susceptibilidad del huésped a la infección reoviral.
Fuente: Strong et al. The molecular basis of viral oncolysis. EMBO Journal, 1998.

Evaluación de la Eficacia Terapéutica Reoviral in vitro, in vivo, y ex vivo.

Hirasawa y cols. realizaron ensayos in vitro utilizando cinco líneas celulares de cáncer de colon humano (Caco-2, DLD-1, HCT-116, HT-29, y SW-48), una línea celular de fibroblastos de colon (CCD-18Co), cuatro líneas celulares de cáncer de ovario (MDAH-2774, PA-1, SKOV3, y SW626), y una línea celular de fibroblastos de ovario (NOV-31), para evaluar la eficacia terapéutica reoviral. Todas las líneas celulares transformadas fueron infectadas por Reovirus tipo 3 Dearing a una MOI de 20 pfu/célula y trasplantadas en tejido subcutáneo murino. A las 48 horas post-infección se observaron pequeños cambios en las líneas celulares CCD-18Co y NOV-31. En contraste, todas las líneas celulares tumorales infectadas con reovirus exhibieron efectos citopáticos. A las 72 horas, > 95% de todas las líneas celulares cancerosas examinadas fueron destruidas.⁽⁴⁾

Para confirmar la oncolisis inducida por la replicación reoviral las células fueron sometidas a marcación metabólica utilizando metionina marcada con azufre-35 a las 24 horas post-infección (líneas celulares colónicas) o a las 12 horas post-infección (líneas celulares ováricas). Los lisados de las líneas celulares infectadas permitieron obtener proteínas reovirales (λ , μ , y σ) que fueron sometidas a inmunoprecipitación con anticuerpos policlonales antireovirales y analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), en donde se evidenció la significativa síntesis de proteína viral en todas las líneas celulares tumorales, a diferencia de líneas celulares normales CCD-18Co y NOV-31 donde se generó poca síntesis.⁽⁴⁾ (Fig. 5)

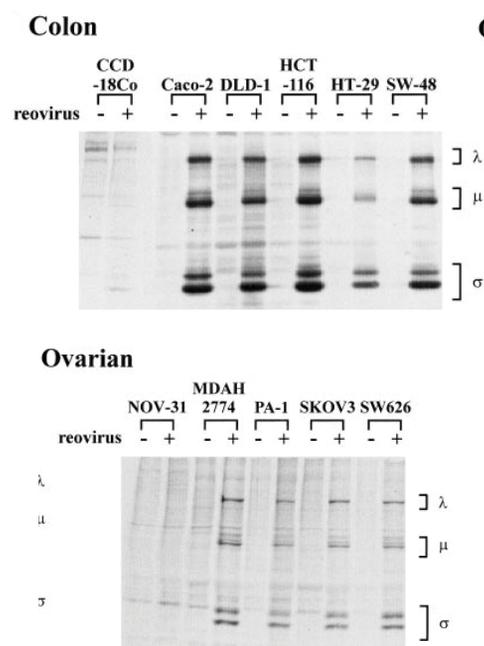


Fig. 5. Síntesis protéica reoviral en líneas celulares humanas de cáncer de colon y ovario.

Adaptado de: Hirasawa et al. Oncolytic reovirus against ovarian and colon cancer. Cancer Research, 2002.

La totalidad de las líneas celulares humanas evaluadas in vitro de cáncer de colon y ovario fueron susceptibles a la infección por reovirus, mientras que las líneas celulares CCD-18Co y NOV-31 fueron resistentes. Además de las células resistentes a la infección por reovirus se convirtieron en susceptibles luego de la transfección con genes que codifican EGFR, ErbB-v, o Sos, todos capaces de activar la señalización Ras.⁽⁴⁾

La inoculación directa de reovirus en tumores xenográficos in vivo resultó en una marcada inhibición del crecimiento tumoral. Significativamente, la administración i.v. de reovirus en ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) fue eficaz en HCT-116, HT-29, DLD-1, y en la línea celular SKOV3 de ratones CD-1 desnudos. ⁽⁴⁾ (Fig. 6) Esto ha permitido combinar reovirus con inmunosupresores para el tratamiento de metástasis.

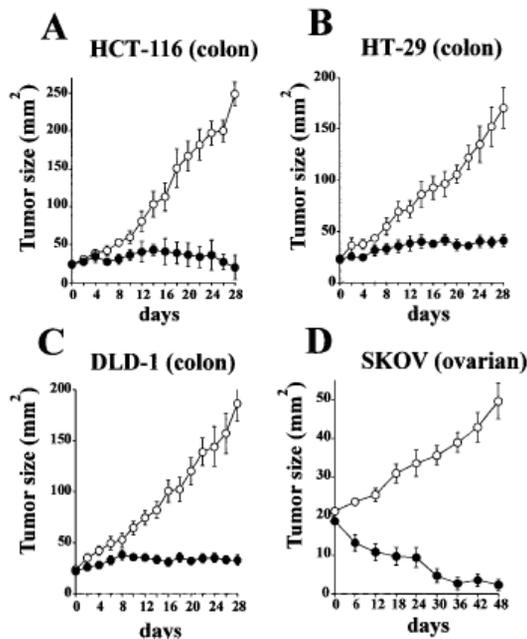


Fig. 6. Efectos del tratamiento intraneoplásico con Reovirus en línea celular de cáncer de colon humano xenoinjertado. Los tumores recibieron reovirus vivos (●) o una dosis equivalente de reovirus UV-inactivados (○).
Fuente: Hirasawa et al. Oncolytic reovirus against ovarian and colon cancer. Cancer Research, 2002.

Los ensayos in vivo se ejecutaron en modelos murino CD-1 desnudos con ascitis por cáncer de ovario humano, al que se le inyectaron 2×10^6 células MDAH-2774 vía intraperitoneal (i.p.) cinco días antes de iniciar el tratamiento reoviral (día 0). El régimen terapéutico utilizado consistió en una inyección i.p. de 5×10^8 p.f.u. de reovirus vivos o virus UV-inactivados (control) cada 2 semanas. ⁽⁴⁾ Concluido el ensayo se obtuvo curación completa del 90%, demostrando que el tratamiento reoviral fue efectivo contra la diseminación tumoral en la cavidad peritoneal. ⁽⁴⁾ Además, todos los murinos del grupo control fallecieron a los 42 días, mientras que 9 de 10 murinos tratados con reovirus permanecieron aparentemente sanos y sin ganancia de peso (debido a

incremento tumoral) por más de 60 días, e inclusive hasta 100 días cuando fueron eventualmente sacrificados. ⁽⁴⁾ (Fig. 7)

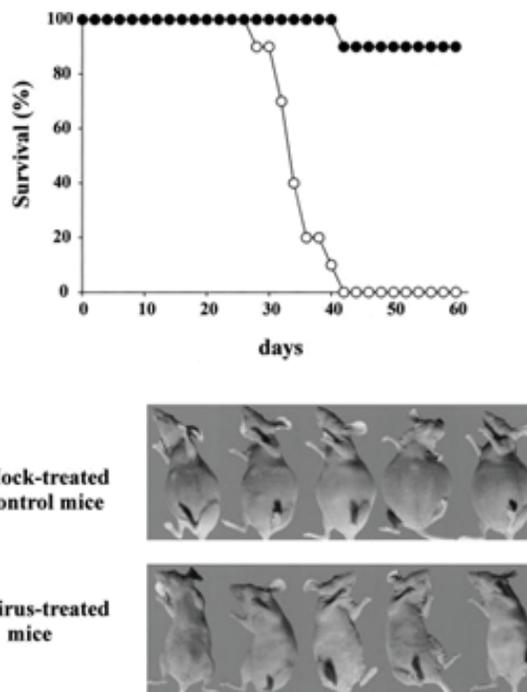


Fig. 7. Efecto de la terapia reoviral en tumores de ovario con formación de ascitis en ratones CD-1 desnudos. Análisis de Kaplan-Meier de supervivencia del tumor tratado con reovirus vivos (●) o con reovirus UV-inactivados (○).
Adaptado de: Hirasawa et al. Oncolytic reovirus against ovarian and colon cancer. Cancer Research, 2002.

En los estudios ex vivo se emplearon biopsias de tejidos de cáncer de ovario humano para estudios in vitro generando resultados interesantes, ya que dada la diversidad en el origen de la muestra (dos con adenocarcinoma endometroide y uno con adenocarcinoma seroso-papilar), las tres resultaron ser susceptibles a infección reoviral, demostrando el uso potencial de reovirus como agente antitumoral. ⁽⁴⁾

Reovirus como adyuvante en Radioterapia

Los reovirus tipo 3 han sido empleados en ensayos preclínicos donde se ha demostrado su seguridad y tolerabilidad vía i.v. e intratumoral. Considerado como agente con actividad antineoplásica, es improbable que posea actividad suficiente para representar una monoterapia. Por el contrario, los reovirus han sido

aplicados como parte de una combinación de estrategia terapéutica con radioterapia, quimioterapia o quimio-radioterapia.

Estudios preclínicos han demostrado un significativo incremento en la citotoxicidad cuando los reovirus son combinados con radioterapia, especialmente a bajas MOIs. Dosis clínicas de fracciones únicas entre 3-10 Gy mostraron fuerte sinergia entre los dos agentes a MOIs de 0.001 y 1, siendo las MOIs más prevalentes en células tumorales o en sus alrededores. El estudio de Twigger y cols. en 2008 utilizó la línea celular HCT-116 tratada con reovirus para demostrar la eficacia del tratamiento combinado con radioterapia, evidenciando con los tintes fluorogénicos fluoresceína diacetato (FDA) (HCT-116 vivas) y yoduro de propidio (HCT-116 muertas) que la aplicación única de radioterapia eliminaba el 43.2% de las células, mientras que la combinación Reovirus-Radioterapia logró el 89.7%.⁽³⁾ (Fig. 8)

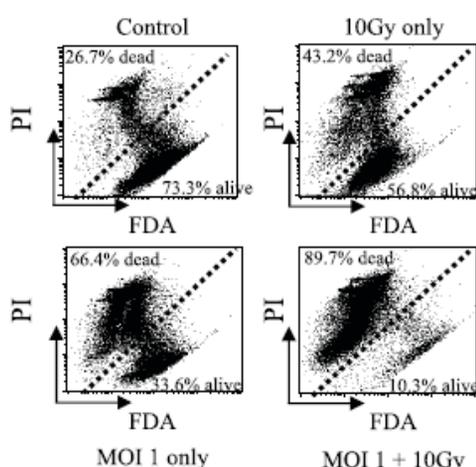


Fig. 8. Análisis de la eficacia reoviral en tratamiento combinado con dosis de radiación a 10 Gy.

Adaptado de: Twigger et al. Enhanced In vitro and In vivo Cytotoxicity of Combined Reovirus and Radiotherapy. Clin Cancer Res, 2008.

La colonización tumoral luego de la administración reoviral vía i.v. es relativamente baja debido al aclaramiento inmune en la circulación, unión inespecífica a tejidos no permisibles, y dificultad para acceder a las células neoplásicas a través del proceso de extravasación.⁽³⁾

El aumento de la citotoxicidad del tratamiento combinado no está relacionado al incremento de la infección reoviral en células irradiadas, debido a que no existe diferencia en la producción viral cuando se

irradian las células antes o después de la infección. De hecho, el incremento de la citotoxicidad está ligado a una mayor tasa de apoptosis.⁽³⁾

La infección reoviral induce la expresión de TNF- α y del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) en células tumorales. Afortunadamente, estos agentes sensibilizan a los efectos de la radiación ionizante en varios sistemas in vitro e in vivo.⁽³⁾

En contraste a la sensibilidad a radiación UV (pérdida > 7 logs del título viral), los reovirus son relativamente resistentes a la radiación ionizante, afectándose la replicación reoviral cuando se aplican fracciones de dosis únicas superiores a 50 Gy (pérdida < 1 log), que son clínicamente irrelevantes. Por lo tanto, no existe riesgo significativo de que los reovirus sean inactivados por la radiación-X entregada al tumor.⁽³⁾ (Fig. 9)

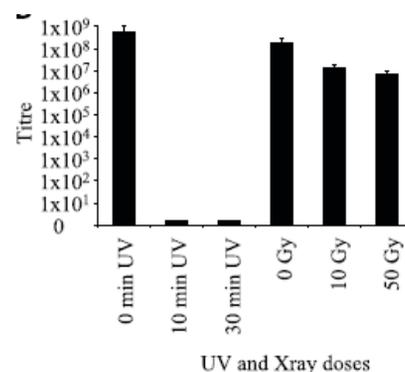


Fig. 9. Efecto de la Radiación UV e ionizante. Adaptado de: Twigger et al. Enhanced In vitro and In vivo Cytotoxicity of Combined Reovirus and Radiotherapy. Clin Cancer Res, 2008.

Significativamente, la radiación a dosis de 1, 3, 5 y 10 Gy resulta en una acumulación dosis-dependiente de células en fase G₂-M del ciclo celular, observándose también una marcada reducción de las células en fase G₁ y S. Este bloqueo aumenta durante 4 a 16 horas luego de la radiación y persiste inclusive hasta 24 horas. Sin embargo, la infección con reovirus genera una perturbación del ciclo celular con una acumulación viral dosis-dependiente de células en fase S y G₂-M del ciclo celular especialmente marcada a las 72 horas.⁽³⁾

Los efectos del tratamiento combinado Reovirus-Radioterapia sobre el ciclo celular son muy marcados, observándose una significativa población celular en fase sub-G₁.⁽³⁾ Esto sugiere que el tratamiento adyuvante con reovirus incrementa los niveles de apoptosis a diferencia de los resultados de la terapia como agente único.

Resultados de los ensayos Clínicos con Reovirus

Reolysin®, un reovirus silvestre tipo 3 (cepa Dearing) ha demostrado según datos preclínicos oncólisis sinérgica cuando se combina con quimioterapia estándar, incluyendo agentes platinos y taxanos, lo que justifica la evaluación clínica de esta combinación de fármacos.

Se ha establecido que la base terapéutica de los tumores con sobreexpresión o mutación del EGFR son los inhibidores del EGFR tales como Erbitux, Tarceva y Vectibix; sin embargo, para el tratamiento de tumores con mutación Ras no existen terapias aprobadas, además de estar contraindicado el uso de inhibidores del EGFR. Afortunadamente los reovirus han demostrado su eficacia en ambas situaciones que implican la activación de la vía Ras. ⁽¹³⁾

Actualmente se han completado 4 ensayos clínicos utilizando reovirus como monoterapia local, 3 ensayos como monoterapia sistémica, 2 ensayos en combinación con radioterapia y 3 ensayos junto a esquemas quimioterapéuticos. ⁽¹³⁾

Estudio Fase II varios tumores metastásicos, incluyendo cáncer de cabeza y cuello. Terapia local en combinación con radiación. REO 008. (2009)

Métodos: Estudio fase II, abierto, multicéntrico, destinado a administrar dosis de radiación de 20 Gy en cinco fracciones consecutivas por día de 4 Gy combinadas con dos inyecciones intratumorales de Reolysin® (1×10^{10} TCID₅₀) los días dos y cuatro. El objetivo primario del ensayo fue evaluar la actividad antitumoral de la combinación Reolysin®-Radioterapia en lesiones tratadas y no tratadas. Los pacientes elegibles fueron aquellos con diagnóstico de cáncer avanzado o metastásico refractarios a la terapia estándar o sin tratamiento curativo. ⁽¹⁴⁾

Resultados: De un total de 16 pacientes altamente pretratados con cáncer avanzado (melanoma (5), colorrectal (4), estómago (1), páncreas (1), ovario (1), pulmón (1), colangiocarcinoma (1) mama (1), y tiroides (1)), la mayoría habían recibido quimioterapia previa (13 pacientes) o radiación (5 pacientes). De los 14 pacientes evaluables para la respuesta, 13 pacientes tenían enfermedad estable (EE). De éstos, 4 pacientes (pulmón (1), melanoma (2), gástrico (1)) mostraron respuesta parcial (RP), y en 2 pacientes (tiroides, ovario) se observaron respuestas menores; para una tasa total de

control de enfermedad (EE + RP + Respuesta Completa) de 93% en las lesiones tratadas. La combinación fue bien tolerada, observándose toxicidad leve (grado 1 ó 2). ⁽¹⁴⁾

Estudio Fase I/II de reovirus oncolíticos mas carboplatino/paclitaxel en pacientes con cáncer sólido avanzado, con énfasis en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (SCCHN). REO 011. (ASCO 2009-2010)

Métodos Fase I: Los pacientes elegibles tenían buen estado general (ECOG PS: 0-2) con cáncer avanzado que no fueron susceptibles de tratamiento curativo o eran refractarios a la terapia estándar, para los que la combinación paclitaxel/carboplatino fue la quimioterapia paliativa adecuada. Los pacientes fueron tratados inicialmente en un estudio abierto, dosis escalada, fase I, recibiendo Reolysin® i.v. días 1-5, carboplatino (i.v. AUC 5) día 1, y paclitaxel (175 mg/m^2) día 1, cada 3 semanas. Reolysin® se administró en una dosis inicial de 3×10^9 TCID₅₀ y luego aumentó a 1×10^{10} y 3×10^{10} TCID₅₀ en cohortes de 3 pacientes. Las principales variables a determinar en el ensayo de dosis-escalada fueron la dosis máxima tolerada (DMT), toxicidad limitante de dosis (TLD), y recomendar una dosis para los estudios de fase II. Las variables secundarias a evaluar fueron la farmacocinética, la respuesta inmune, y la actividad antitumoral. ^(15,16)

Resultados Fase I: 17 pacientes pretratados (11 hombres, 6 mujeres, edad media de 55 años) con cáncer avanzado: cáncer de cabeza y cuello (10), melanoma (4), cáncer peritoneal/endometrial (2), y sarcoma (1) recibieron 82 ciclos de tratamiento. No hubo TLDs en la dosis escalada. Las toxicidades fueron de grado 1 y 2, y contó con náuseas, vómitos, fatiga, dolores musculares, fiebre, neutropenia, linfopenia, trombocitopenia, e hipotensión que ocurrieron 2 a 6 horas posteriores a la administración del reovirus y se resolvieron completamente con acetaminofén y AINEs. Estos síntomas fueron más frecuentes y pronunciados en el primer ciclo. ^(9,13,15)

La combinación Reolysin®/Paclitaxel/Carboplatino generó un embotamiento de la respuesta inmune antiviral en contraste al virus en monoterapia. Las tasas de respuesta en 15 pacientes evaluables fueron: RP en 4 pacientes, EE en 6 pacientes, y progresión de la enfermedad en 5 pacientes. Es de destacar que todas las RPs y 4/5 EEs poseían cáncer de cabeza y cuello. ⁽¹⁵⁾

Métodos Fase II: Se mantuvieron los parámetros de fase I. El objetivo principal de la fase II con expansión de la cohorte en 14 pacientes con cáncer de cabeza y cuello fue valorar la tasa de respuesta.^(15,16)

Resultados Fase II: 31 pacientes (24 varones, 7 mujeres; edad media de 59 años) con cáncer de cabeza y cuello (24), melanoma (4), cáncer peritoneal/endometrial (2), y sarcoma (1) recibieron 147 ciclos (mediana 5, rango 1-8) de tratamiento. No hubo TLDs en la dosis escalada. Las toxicidades fueron de grado 3 y 4, e incluyen anemia, leucopenia, neutropenia, linfopenia, trombocitopenia, infección e hipotensión. Se presentó la respuesta de anticuerpos neutralizantes antireovirales. El tratamiento de cáncer de cabeza y cuello se realizó a dosis máxima (3×10^{10} DICT₅₀) con el fin de seguir evaluando la respuesta del tumor. En total, 19 pacientes con cáncer de cabeza y cuello recibieron al menos dos ciclos y fueron evaluables para la respuesta; la mayoría eran SCCHN refractarios a la quimioterapia previa basada en platino para la enfermedad recurrente/metastásica.⁽¹⁶⁾ (Figs. 10 y 11) Se observó RP en 8 pacientes (42%) y EE en 6 pacientes (32%). Una RP y EE adicional se observaron entre los 4 pacientes con melanoma maligno.

La evaluación de esta combinación en un ensayo aleatorizado de fase III en el SCCHN ha sido aprobado en EE.UU, Reino Unido, Bélgica y Canadá debido a la tasa de respuesta al tratamiento del 42% y a la tasa total de beneficio clínico del 74%, siendo estas cifras notablemente superiores a la tasa de respuesta promedio de 10% para la enfermedad cuando Reolysin® no se añade a la quimioterapia estándar.⁽¹³⁾



Fig. 10. Fase II, esquema Reolysin®/Paclitaxel/Carboplatino. Respuesta parcial en Tumor de Cabeza y Cuello; carcinoma de células escamosas de rápida progresión. Respuesta mantenida por 3 ciclos.

Adaptado de: Harrington K. Conference Oncolytics. November 2010.

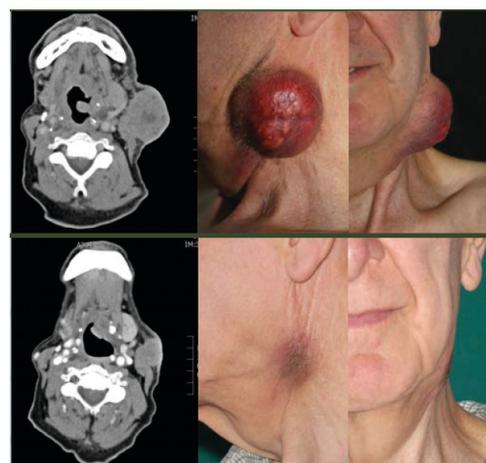


Fig. 11. Fase II, Reolysin®/Paclitaxel/Carboplatino. Respuesta parcial en Tumor de Cabeza y Cuello; carcinoma de células escamosas pobremente diferenciado.

Respuesta mantenida por 3 ciclos.

Adaptado de: Harrington K. Conference Oncolytics. November 2010.

Estudio Fase II de administración intravenosa de Reolysin en el tratamiento de pacientes con sarcoma de hueso y tejidos blandos metastásico al pulmón. REO 014. (ASCO 2009)

Métodos: Estudio fase II, abierto, agente único, diseñado para caracterizar la eficacia y seguridad de Reolysin® i.v. cada 28 días en pacientes con sarcoma de hueso o tejido blando con metástasis pulmonares, utilizando un diseño de Simon en dos etapas. 38 pacientes fueron asignados a la primera etapa. Si uno o más pacientes experimentaban beneficio clínico (EE prolongada > 6 meses, RP o respuesta completa) de hasta 52 pacientes, podría ser devengados. El agente será considerado activo si se observan 3 o más respuestas o EE prolongada.

Resultados: Desde julio de 2007, pacientes de 43 años de edades entre 19 a 76 (mediana 49), enrolados (23 hombres, 20 mujeres), recibieron un total de 141 ciclos (rango 1-18). Todos los pacientes tenían valoración funcional grado 1 (29 pacientes) o grado 0 (14 pacientes). 38 pacientes recibieron quimioterapia previa, radioterapia, o combinaciones de agentes biológicos para su enfermedad metastásica; 15 pacientes recibieron más de 3 regímenes de quimioterapia. Los subtipos de sarcoma incluyen: sarcoma sinovial (13), osteosarcoma (7), leiomiomasarcoma (7), histiocitoma fibroso maligno (5), Ewing/tumor neuroectodermal primitivo (1), cordoma (1), otros (9).

Los efectos secundarios fueron leves a moderados (grado 1-2) incluyendo fiebre, escalofríos, y fatiga. Dos pacientes experimentaron efectos secundarios respiratorios (tos y disnea) y 2 pacientes tuvieron diarrea. Efectos hematológicos secundarios incluyeron neutropenia de grado 2-3 (6 pacientes) y trombocitopenia de grado 2 (2 pacientes). Un paciente experimentó elevación de una enzima hepática (AST) de grado 2. De los 33 pacientes evaluables para la respuesta, 14 pacientes (42%) tuvieron EE > 2 meses, y 5 pacientes EE > 6 meses.⁽¹⁷⁾

CONCLUSIONES

Los reovirus se dirigen específicamente a tumores con una vía de señalización Ras activada, directa o indirecta, por lo que representan una alternativa terapéutica adyuvante en el tratamiento de cáncer de colon, de ovario, de cabeza y cuello, melanoma, sarcomas, entre otros, asegurando que el tejido sano será mínimamente afectado.

Los estudios preclínicos y clínicos analizados revelan que el uso de reovirus es seguro, tolerable y eficaz. Varios ensayos clínicos permitieron identificar efectos secundarios, siendo los más representativos aquellos síntomas similares a infección gripal y toxicidad hematológica grado 2, con la peculiaridad de ser menos prevalentes en los ciclos sucesivos.

La terapia reoviral es eficaz para el tratamiento de tumores localizados y metastásicos. En la actualidad, el principal tratamiento utilizado en pacientes con estadios tempranos de cáncer es la resección quirúrgica, incluyendo quimioterapia o radioterapia. En estadios avanzados o metastásicos las alternativas terapéuticas disminuyen así como las tasas de curación, derivándose al paciente a terapia paliativa. Significativamente, la selectividad lítica reoviral asegura el acceso terapéutico a las micrometástasis en áreas donde la resección quirúrgica genera graves secuelas, especialmente metástasis cerebrales, así como en áreas de invasión no detectadas.

El beneficio del tratamiento oncológico reoviral sería notablemente significativo si el paciente se sometiera a un esquema combinado, principalmente radioterapia, quimioterapia dirigida, y terapia inmunosupresora. Además, como estrategia terapéutica intrínseca, los reovirus afectan a las células con elevadas tasas mitóticas e incrementan la respuesta inmune innata contra el

tumor, generando un microambiente menos favorable para el crecimiento del cáncer.

En relación al costo del tratamiento reoviral, deberían realizarse estudios para demostrar diferencias estadísticamente significativas en las tasas de hospitalización y cantidad de ciclos terapéuticos necesarios, que definan el uso de reovirus como costo-efectivo al disminuir los gastos por internación y tratamiento frente a protocolos establecidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Etoh T., Himeno Y., Matsumoto T., Aramaki M., Kawano K., Nishizono A., et al. Oncolytic Viral Therapy for Human Pancreatic Cancer Cells by Reovirus. *Clin Cancer Res.* 2003 Mar; 9(3):1128-23.
2. Norman K., Hirasawa K., Yang A., Shields M., Lee P. Reovirus oncolysis: The Ras/Ral/GEF/p38 pathway dictates host cell permissiveness to reovirus infection. *PNAS.* 2004 Jul; 101(30):11099-104.
3. Twigger K., Vidal L., White C., DeBono J., Bhide S., Coffey M., et al. Enhanced *In vitro* and *In vivo* Cytotoxicity of Combined Reovirus and Radiotherapy. *Clin Cancer Res.* 2008 Feb; 14(3):912-23.
4. Hirasawa K., Nishikawa S., Norman K., Alain T., Kossakowska A., Lee P. Oncolytic reovirus against ovarian and colon cancer. *Cancer Research.* 2002 Mar; 62(6):1696-701.
5. Hirasawa K., Nishikawa S., Norman K., Coffey M., Thompson B., Yoon C., et al. Systemic reovirus therapy of metastatic cancer in immune-competent mice. *Cancer Research.* 2003 Jan; 63(2):348-53.
6. Kottke T., Thompson J., Días R., Pulido J., Wilmon C., Coffey M., et al. Improved systemic delivery of oncolytic reovirus established tumors using preconditioning with cyclophosphamide-mediated Treg modulation and interleukin-2. *Clin Cancer Res.* 2009 Jan; 15(2):561-69.
7. Strong J., Coffey M., Tang D., Sabinin P., Lee P. The molecular basis of viral oncolysis: usurpation of the Ras signaling pathway by reovirus. *The EMBO Journal.* 1998; 17(12):3351-62.
8. Prestwich R., Errington F., Ilett E., Morgan R., Scott K., Kottke T., et al. Tumor infection by oncolytic reovirus primes adaptive antitumor immunity. *Clin Cancer Res.* 2008 Nov; 14(22):7358-66.
9. Vidal L., Pandha H., Yap T., White C., Twigger K., Vile R., et al. A phase I study of intravenous oncolytic reovirus type 3 Dearing in patients with

- advanced cancer. *Clin Cancer Res.* 2008 Nov; 14(21):7127-37.
10. Wu W., O'Reilly M., Langley R., Tsan R., Baker C., Bekele N., et al. Expression of epidermal growth factor (EGF)/transforming growth factor-A by human lung cancer cells determines their response to EGF receptor tyrosine kinase inhibition in the lungs of mice. *Mol Cancer Ther.* 2007 Oct; 6(10):2652-63.
 11. Chien Y., White M. RAL GTPases are linchpin modulators of human tumour-cell proliferation and survival. *EMBO reports.* 2003 Jul; 4(8):800-6.
 12. Prestwich R., Errington F., Steele L., Ilett E., Morgan R., Harrington K., et al. Reciprocal Human Dendritic Cell–Natural Killer Cell Interactions Induce Antitumor Activity Following Tumor Cell Infection by Oncolytic Reovirus. *J Immunol.* 2009 Oct; 183(7): 4312-21.
 13. Harrington K. ONCY Investor Presentation. Conference Oncolytics. 2010 Nov 10; Chicago, IL, USA; 2010. p. 1-18.
 14. Harrington K., Melcher A., Saunders M. Results of U.K. Phase II REOLYSIN® and Radiation
 15. Karapanagiotou E., Pandha H., Hall G., Chester J., Melcher A., Coffey M., et al. Phase I/II trial of oncolytic reovirus (Reolysin) in combination with carboplatin/paclitaxel in patients (pts) with advanced solid cancer. *J Clin Oncol.* 2009; 27:15s. (suppl; abstr e14519)
 16. Karapanagiotou M., Chester J., Pandha H., Gill G., Coffey M., Mettinger K., et al. A phase I/II study of oncolytic reovirus plus carboplatin/paclitaxel in patients with advanced solid cancers with emphasis on squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN). *J Clin Oncol.* 2010; 28:7s. (suppl; abstr 3080)
 17. Mita A., Sankhala K., Sarantopoulos J., Carmona J., Okuno S., Goel S., et al. A phase II study of intravenous (IV) wild-type reovirus (Reolysin) in the treatment of patients with bone and soft tissue sarcomas metastatic to the lung. *J Clin Oncol.* 2009; 27:15s. (suppl; abstr 10524)