



INSTITUTO CAVANILLES DE BIODIVERSIDAD Y BIOLOGÍA EVOLUTIVA

# EVOLUCIÓN EXPERIMENTAL DE UN VIRUS ONCOLÍTICO

**RAQUEL GARIJO OLMO**

2015

Programa oficial de Postgrado en Biodiversidad

Director: **Rafael Sanjuán Verdeguer**





Memoria presentada por Raquel Garijo Olmo para optar al grado de Doctora en Biología por la Universidad de Valencia.

Raquel Garijo Olmo.

Este trabajo ha sido dirigido por el Doctor Rafael Sanjuán Verdeguer.

Rafael Sanjuán Verdeguer



*“Ni las victorias de los juegos olímpicos, ni las que se alcanzan en batallas, hacen al hombre feliz. Las únicas que le hacen dichoso son las que consigue sobre sí mismo. Has vencido una, dos, muchas veces; combate aún. Si llegas al fin a vencer, serás dichoso toda tu vida, como si hubieras vencido siempre”.*

**Epicteto**



*A mi pequeña, Lucía*





**ÍNDICE**

---



<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
<b>1. Evolución experimental.....</b>	<b>6</b>
1.1. Evolución experimental de virus de ARN.....	6
1.2. Conceptos básicos de evolución .....	8
1.3. El virus de la estomatitis vesicular (VSV).....	15
<b>2. Cáncer: Una batalla pendiente.....</b>	<b>21</b>
2.1. Biología del cáncer.....	21
2.2 P53 y sus implicaciones en el proceso tumoral.....	22
2.3 Desregulación de la cascada del Interferón (IFN) en células tumorales.....	24
2.4 Tratamientos contra el cáncer: viroterapia.....	25
<b>3. Virus oncolíticos.....</b>	<b>26</b>
3.1 Historia de los virus oncolíticos.....	26
3.2 Aspectos fundamentales de un virus oncolítico.....	31
3.3 Dificultades y riesgos de la terapia con virus oncolíticos.....	32
3.4 Propiedades oncolíticas de VSV .....	35
3.4.1 El virus oncolítico VSV-MΔ51 .....	37
3.5 Evolución experimental: un paso más en el desarrollo de nuevos tratamientos contra el cáncer.....	38
<b>4. Descripción del sistema experimental.....</b>	<b>40</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>48</b>
<b>1. Virus y células.....</b>	<b>49</b>
1.1 Cultivos celulares.....	49
1.2 Cepas virales.....	50
<b>2. Infecciones .....</b>	<b>51</b>
2.1 Infecciones en medio líquido.....	51
2.2 Titulación viral por plaqueo en medio semisólido.....	51

<b>3. Evolución experimental.....</b>	<b>52</b>
<b>4. Determinación de la eficacia viral.....</b>	<b>53</b>
4.1 Ensayos de competencias.....	53
4.2 Curvas de crecimiento viral.....	54
<b>5. Citotoxicidad.....</b>	<b>54</b>
5.1 Ensayos de viabilidad celular a alta MOI.....	54
5.2 Concentración efectiva media (EC50).....	56
<b>6. Secuenciación y análisis de secuencias.....</b>	<b>57</b>
<b>7. Funcionalidad de una proteína.....</b>	<b>59</b>
7.1 Ensayo de Western blot.....	59
<b>8. Cuantificación de la secreción de Interferón.....</b>	<b>60</b>
8.1 ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).....	60
8.2 RT-PCR cuantitativa a tiempo real .....	60
<b>9. Mutagénesis dirigida.....</b>	<b>62</b>
<b>10. Transfección y recuperación del virus.....</b>	<b>64</b>
<b>11. Selección fenotípica de mutantes.....</b>	<b>65</b>
11.1 Plaqueo de virus en diferentes tipos celulares.....	65
11.2 Medición del tamaño de calva .....	66
<b>12. Experimentos in vivo.....</b>	<b>66</b>
12.1 Purificación del virus.....	66
12.2 Inducción del tumor en el ratón e infecciones.....	67

## **RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL..... 69**

<b>1. Selección, desarrollo y posterior cribado de un panel de mutantes simples para la determinación de su capacidad oncolítica.....</b>	<b>71</b>
1.1 Selección de mutantes .....	73
1.2 Análisis fenotípico del panel de mutantes.....	75
1.3 Análisis fenotípico de los mutantes PΔ120 y P120R .....	82
1.4 Cuantificación de la síntesis de IFN.....	85
1.5 Determinación de la eficacia de los mutantes.....	88
1.6 Determinación de la EC <sub>50</sub> .....	93

<b>2. Desarrollo de un virus oncolítico mediante evolución experimental.....</b>	<b>97</b>
2.1 Pases seriados y eficacia biológica de los virus evolucionados.....	95
2.2 Efecto citotóxico.....	101
2.3 Bases moleculares de la adaptación.....	104
2.4 Capacidad oncolítica y eficacia In Vivo .....	106
2.5 Dosis media efectiva (EC50).....	106
2.6 Determinación de la eficacia de L3 en ensayos In vivo.....	109
<b>3. Estabilidad genética de un virus oncolítico .....</b>	<b>115</b>
3.1 Pases seriados y análisis de los linajes evolucionados.....	117
3.2 Eficacia de los clones evolucionados.....	117
3.3 Determinación de la citotoxicidad de los linajes evolucionados.....	119
3.4 Cuantificación de la secreción de IFN.....	121
3.5 Análisis genotípico de los virus evolucionados.....	123
3.6 Secuenciación por Sanger .....	124
3.7 Secuenciación masiva .....	124
3.8 Selección de clones biológicos y determinación del título viral.....	128
3.9 Cuantificación de la secreción de IFN de los clones.....	129
3.10 Caracterización genotípica del clon 65.....	131
3.11 Comportamiento del clon 65 aislado o en la población.....	134
<b>4. Discusión general.....</b>	<b>138</b>
4.1 Mutaciones puntuales para el desarrollo de virus oncolíticos.....	138
4.2 Virus más selectivos mediante evolución experimental.....	142
4.3 Bases moleculares del proceso adaptativo.....	144
4.4 Importancia de la evaluación de la estabilidad genética de un virus de oncolítico.....	146
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>151</b>

<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>154</b>
<b>INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA.....</b>	<b>178</b>

Artículos publicados a partir de los datos y resultados obtenidos en la presente tesis:

- **Garijo, R.**, Hernández-Alonso, P., Rivas, C., Diallo, J.S., Sanjuán, R. (2014). Experimental evolution of an oncolytic vesicular stomatitis virus with increased selectivity for p53-deficient cells. **PLoS One**. Jul 10;9(7)
- **Garijo, R.**, Cuevas, J.M and Sanjuán, R. Virus-virus interactions and fitness trade-offs determine the evolution of interferon suppression in an RNA virus. **Plos Pathogens**. En revision.

Otras publicaciones relacionadas:

- **Garijo, R.\***, Furió, V.\*, Durán, M., Moya, A., Bell, J.C., Sanjuán, R. (2012). Relationship between within-host fitness and virulence in the vesicular stomatitis virus: correlation with partial decoupling. **Journal of Virology** 86: 12228-12236. \*Equal contribution.





---

## **INTRODUCCIÓN**



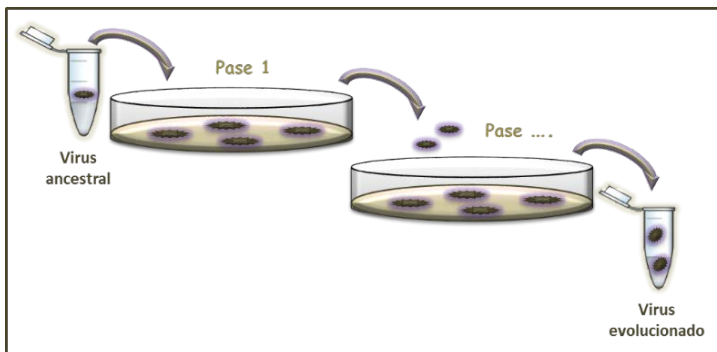
# 1. Evolución experimental

## 1.1 Evolución experimental de virus de ARN

La evolución experimental es una herramienta que permite el desarrollo y seguimiento de hipótesis evolutivas bajo condiciones controladas de laboratorio. A lo largo de los años, se han descrito múltiples aplicaciones de la evolución experimental en diferentes sistemas, desde organismos menos complejos como virus y bacterias, hasta modelos animales más complejos como *Drosophila*, nematodos o ratones (Garland *et al.* 2009). Para el estudio de un mecanismo adaptativo concreto mediante evolución experimental los virus constituyen un excelente modelo. Poseen un ciclo de replicación corto y alcanzan tamaños poblacionales elevados poco en tiempo. Esa rápida replicación suele ir ligada a una elevada tasa de mutación que les permite evolucionar rápidamente. Además, sus genomas son sencillos y fácilmente manejables, lo que nos permite conocer en profundidad las bases moleculares del proceso adaptativo (Buckling *et al.* 2009; Elena *et al.* 2007; Domingo 2006). En general, este tipo de experimentos de evolución rápidos, sencillos y bajo unas condiciones totalmente controladas, permiten asignar fácilmente relaciones causa-efecto, difíciles de concluir en el estudio de poblaciones naturales.

Los experimentos de evolución con virus son conceptualmente muy simples. Partiendo de una población homogénea o no del virus

problema se realizan pases seriados en un determinado hospedador bajo unas condiciones controladas. Tanto la selección del hospedador a utilizar como las condiciones de cultivo vendrán determinadas por la cuestión que queramos abordar. Tras un tiempo de incubación, se realiza un pase de una cantidad conocida de virus a un cultivo fresco (Figura 1). Cada nueva infección se considera un pase de evolución y cada pase puede ser conservado por ultra-congelación, lo que permite disponer de todas las etapas del experimento para realizar cualquier tipo de estudio. Generalmente, el pase final es el utilizado para la determinación de factores como cambios en la capacidad de replicación, virulencia, modificaciones genéticas o cualquier otro rasgo de interés del virus evolucionado respecto al virus ancestral. (Sanjuán *et al.* 2011).



**Figura 1.** Diagrama de un experimento típico de evolución experimental con virus.

Un trabajo pionero en el ámbito de la evolución experimental data de 1967 (Mills *et al.* 1967), donde sometieron a una serie de pases de evolución bajo presión selectiva al ARN del bacteriófago Q $\beta$ . Los resultados del trabajo fueron un aumento en la tasa de replicación del ARN y una disminución drástica del tamaño del genoma, manteniendo únicamente las regiones esenciales que permitían su continuidad, observándose así, en un corto plazo de tiempo, las consecuencias evolutivas de la presión selectiva sobre el genoma de Q $\beta$ . A raíz de ese trabajo, existe infinidad de estudios que usan como herramienta la evolución experimental en diferentes sistemas de experimentación abarcando un amplio abanico de aplicaciones. Algunas meramente experimentales para el estudio evolutivo de un organismo, permitiendo validar o rechazar teorías evolutivas (Elena *et al.* 2003). Otras, de relevancia en el campo de la biomedicina, como la determinación de la patogénesis y virulencia de un agente patógeno, la predicción de resistencia a fármacos o anticuerpos (Nickle *et al.* 2007; Pond *et al.* 2012), el desarrollo de cepas virales atenuadas a modo de vacuna (Oldstone 2010; van der Noordaa *et al.* 1967; Jordan *et al.* 2011), o el desarrollo de virus oncolíticos (Bauzon *et al.* 2012; Sanjuán *et al.* 2015).

## 1.2 Conceptos básicos de evolución

### *Selección*

La selección natural es la supervivencia diferencial de unos individuos frente a otros en base a su eficacia biológica. Si el carácter seleccionado es en parte heredable, dará lugar un cambio en las frecuencias alélicas en la siguiente generación que, en última instancia, conducirá al reemplazamiento de unos genotipos por otros más aptos. La eficacia biológica puede medirse de muchas formas, pero en el contexto de la evolución experimental de virus esto suele hacerse o bien determinando componentes de eficacia como la tasa de crecimiento, la cantidad de progenie producida por ciclo infeccioso, etc., o bien mediante ensayos de competencia en los cuales se determina el cambio en la frecuencia de dos variantes competidores a lo largo del tiempo. La selección natural será más intensa cuanto mayor sean las diferencias de eficacia (coeficiente de selección). Asimismo, la importancia de la selección crece con el tamaño efectivo de la población, pues un mayor tamaño permite la aparición de más variantes genéticas potencialmente ventajosas y, además, disminuye los efectos estocásticos debidos a la deriva genética.

### *Deriva genética*

La deriva genética es la variación en las frecuencias alélicas debida al efecto de muestro aleatorio entre generaciones. Será tanto más

intensa cuanto menor sea el tamaño poblacional efectivo, pues el error de muestreo aumentará. De esa forma, un alelo incluso siendo deletéreo podrá aumentar su frecuencia en la población. Pese a sus enormes tamaños poblacionales, los virus también pueden sufrir deriva genética puesto que frecuentemente experimentan fuertes cuellos de botella poblacionales durante su transmisión, de manera que cada nueva infección de un individuo hospedador puede iniciarse por una o pocas partículas virales (Gutiérrez *et al.* 2012; Butcher 1995). Estos cuellos de botella reducirán el tamaño efectivo de la población viral órdenes de magnitud por debajo de los valores censales dados por el título viral. Cuando la deriva actúa de manera reiterada sobre una población y en ausencia de recombinación genética, se perderán irreversiblemente ciertos genotipos y, puesto que la mayoría de mutaciones son deletéreas, esto conllevará una pérdida de eficacia biológica, conocida como trinquete de Müller. La primera evidencia experimental del trinquete de Müller en virus de ARN vino dada por un trabajo en el que sometía al bacteriófago  $\phi 6$  a sucesivos cuellos de botella, observándose una reducción significativa de la eficacia poblacional (Chao 1990). Posteriormente fue extendida a otros virus como el virus de la estomatitis vesicular (VSV) (Elena *et al.* 1996) o HIV-1 (Yuste *et al.* 1999).

## Mutación espontánea

La mutación es la fuente última de variación genética y por tanto es necesaria para la evolución de los organismos a largo plazo. Las tasas de mutación han sido estimadas por métodos bioquímicos y genéticos y en virus de ARN se encuentran en un rango de  $10^{-4}$  a  $10^{-6}$  sustituciones por nucleótido y por ronda de replicación (*s/n/r*) (Sanjuán *et al.* 2010; Drake 1999). Sin embargo, los virus de ADN se encuentran en un rango de  $10^{-8}$  a  $10^{-6}$  *s/n/c*, y los organismos unicelulares y pluricelulares presentan tasas aún menores. Las elevadas tasas de mutación de los virus de ARN son debidas principalmente a la baja fidelidad de la polimerasa y ausencia de actividad correctora (Steinhauer *et al.* 1992; Sousa 1996; Černý *et al.* 2014; Walker *et al.* 2015), así como de mecanismos de reparación post-replicativa. El resultado de esta elevada tasa de mutación combinado con la rápida expansión poblacional que presentan los virus de ARN, hace que cuando hablemos de una población viral nos estemos refiriendo a una población altamente heterogénea a veces llamada cuasiespecie viral (Domingo 2006). Las altas tasas de mutación son, en definitiva, un factor clave a la hora de explicar la rápida evolución de los virus de ARN. Sin embargo, se da la paradoja de que, puesto que la mayoría de mutaciones espontáneas son deletéreas, las altas tasas de mutación elevan también de manera notoria la carga genética de las poblacionales, definida como la pérdida de eficacia media debida a la mutación. Las poblaciones virales de ARN se encuentran pues



replicando en una ambigüedad, por un lado la elevada tasa de mutación les confiere una mayor capacidad adaptativa, y sin embargo, esa elevada tasa de error constituye a la vez un peligro para la población viral, pudiendo disminuir la eficacia de la población hasta extinguirla (Chao 1990; Duarte *et al.* 1992; Eigen *et al.* 1988). Existen evidencias experimentales que sitúan a los virus de ARN replicando cerca de su umbral de error, es decir, replicando con unas tasas de mutación muy cercanas al extremo de sus posibilidades (Eigen *et al.* 1988; Crotty *et al.* 2001; Anderson *et al.* 2004).

### **Recombinación**

Pese a que los virus carecen obviamente de reproducción sexual, pueden no obstante recombinar. El mecanismo principal de recombinación en virus es el salto de molde de la polimerasa durante la replicación, de forma que en células co-infectadas por dos más variantes del virus, puede originarse un recombinante (Pérez-losada *et al.* 2105). En virus de genoma segmentado, además, se da la reordenación de segmentos de manera análoga a lo que ocurre en los cromosomas celulares. Un ejemplo bien conocido es el virus de la gripe, compuesto por ocho segmentos que, al reordenarse, pueden dar lugar a cambios antigénicos a veces asociados a la aparición de pandemias (Steel *et al.* 2014; Chao 1991). El fenómeno de recombinación juega de hecho un papel importante en la adaptación, como ocurre por ejemplo en poliovirus, donde se han detectado recombinantes tras la

administración de la vacuna oral trivalente compuesta por los tres serotipos atenuados del virus de la polio (Wimmer *et al.* 1993). Quizás uno de los ejemplos más claros de recombinación sea el de HIV-1, que presenta numerosas formas recombinantes entre subtipos (Engelman *et al.* 2014)). Por el contrario, los virus de polaridad negativa no segmentados recombinan muy infrecuentemente (Han et al. 2011).

Esto es debido a que en estos virus el ARN está altamente protegido por nucleoproteínas, dificultando así los saltos de molde. El hecho de que algunos virus de ARN de polaridad negativa no segmentados muestren altas tasas de evolución evidencia que el fenómeno de recombinación no es imprescindible para la adaptabilidad de los virus de ARN. Por ejemplo, el virus respiratorio sincitial es un virus de ARN de polaridad negativa no segmentado y presenta una tasa de evolución de  $2.3 \times 10^{-3}$  s/n/c, mientras que el virus de la fiebre del valle del Rift, con un genoma de ARN de polaridad negativa segmentado, presenta una tasa de evolución diez veces menor, concretamente  $2.3 \times 10^{-4}$  s/n/c (Sanjuán 2012).

### ***Epistasia***

Cuando existe acumulación de mutaciones, la interacción entre los efectos de estas mutaciones puede jugar un papel importante en la evolución (Desai *et al.* 2007). A estas interacciones genéticas se las conoce genéricamente como epistasias. La epistasia puede ser clasificada como positiva o negativa dependiendo de si las mutaciones

interaccionan aumentando la eficacia biológica o disminuyéndola. Es decir, cuando la eficacia de una población en presencia de dos mutaciones es mayor de la esperada estaremos hablando de epistasia positiva. Por el contrario, cuando la presencia de dos mutaciones produzca una eficacia menor de la esperada diremos que se está dando epistasia negativa. Las interacciones genéticas pueden tener consecuencias diversas dependiendo de la naturaleza sexual/asexual de la población. En poblaciones sexuales, la epistasia negativa aumenta la eficacia de la población en equilibrio mutación-selección (Kondrashov *et al.* 1988). De manera más general, el mapa genotipo-fenotipo se complica por la existencia de epistasia, dando lugar a paisajes adaptativos rugosos que alternan picos y valles de eficacia conectados por uno o pocos cambios genotípicos (Elena *et al.* 2007). Esto hace que mediante el análisis de mutaciones individuales sea a menudo difícil reproducir las trayectorias evolutivas de los virus. Un trabajo que describe este efecto es el de Bordería *et al.* (2015). Donde tras adaptar un virus de ARN, concretamente el virus coxsackie B3, a dos ambientes diferentes observan adaptación específica a cada uno de ellos incrementándose la eficacia total de la población. Sin embargo, un análisis genómico exhaustivo detecta la presencia a baja frecuencia de variantes de baja eficacia entre la población. Curiosamente, sólo la combinación de los diferentes variantes encontrados reproduce la eficacia del virus adaptado, lo que sugiere que la presencia de variantes minoritarias contribuye significativamente al fenotipo observado (Vignuzzi *et al.* 2006)

### ***Evolución paralela***

De manera general, la evolución es un proceso estocástico, pues depende de la aparición de mutaciones aleatorias y también de la deriva genética. Sin embargo, a veces, la evolución viral puede mostrar un comportamiento reproducible. Algunos estudios como en Cuevas *et al.* (2002); Novella *et al.* (2004) o Remold *et al.* (2008) muestran como tras evolucionar varios linajes independientes de VSV, los diferentes linajes muestran en repetidas ocasiones cambios idénticos en el genoma, lo que se conoce como evolución paralela. Este fenómeno es probablemente debido a la fuerte acción de la selección en poblaciones de gran tamaño donde a su vez el número de mutaciones producidas es muy alto. De este modo, en réplicas independientes de la evolución tienden a aparecer y seleccionarse los mismos variantes ventajosos. La evolución paralela de secuencias virales tiene gran utilidad práctica, puesto que nos ofrece una herramienta para identificar mutaciones probablemente ventajosas en un ambiente concreto.

### ***Trueques adaptativos***

En general, los virus de ARN son capaces de adaptarse a los cambios de manera eficaz, sin embargo, si observamos este fenómeno de adaptación más detalladamente, cómo se ha observado en numerosos trabajos de adaptación viral mediante evolución experimental para VSV (Holland *et al.* 1991; Turner 2000; Novella 2004), podemos ver cómo el aumento de la eficacia biológica del virus en ese

nuevo hospedador tiene un coste en términos de eficacia biológica, asociado a una disminución en el rango de hospedadores en los que va a poder replicar ese virus eficazmente. Este fenómeno de atenuación del virus en hospedadores diferentes al que ha sido adaptado, puede tener aplicaciones prácticas, como por ejemplo, la producción de vacunas con virus atenuados (Jordan *et al.* 2011; Kan *et al.* 2012), o la producción de cepas virales con características oncolíticas, fenómeno en el que profundizaremos más adelante (Lichty *et al.* 2004). En última instancia, estos trueques se deben probablemente al pequeño tamaño genómico de los virus de ARN, que hace que muchas de sus proteínas sean multifuncionales (Desau *et al.* 2012; Acosta *et al.* 2013). A consecuencia de ello, los cambios que son beneficiosos para un aspecto del ciclo infeccioso o en un ambiente concreto pueden tornarse deletéreos en otros ambientes o acarrear costes de eficacia. Los trueques adaptativos se ponen de manifiesto en virus que deben infectar hospedadores muy distintos, como por ejemplo los virus transmitidos por artrópodos (arbovirus) entre los cuales se encuentra VSV así como el virus del dengue, entre otros (Hanada *et al.* 2004; Jenkins *et al.* 2002).

## **1.2 El virus de la estomatitis vesicular (VSV)**

VSV es el virus causante de la estomatitis vesicular, una enfermedad frecuente en el ganado con consecuencias económicas importantes en

este sector, especialmente en Sudamérica. Sin embargo, la infección en humanos es rara y presenta una sintomatología leve, similar a la de la gripe (Tesh *et al.* 1969). Hasta la fecha VSV es un virus restringido al continente americano, donde se conocen mayoritariamente dos serotipos: VSV Indiana y New Jersey. Este último parece ser más virulento debido a diferencias en la proteína G que le dotan de mayor infectividad (Martínez *et al.* 2005).

Pertenece a la familia *Rhabdoviridae*, género *Vesiculovirus*, VSV es un virus con envuelta, de genoma no segmentado formado por ARN monocatenario de polaridad negativa, que codifica para cinco proteínas: N, P, M, G y L (Rose *et al.* 2001) (Figura 2).

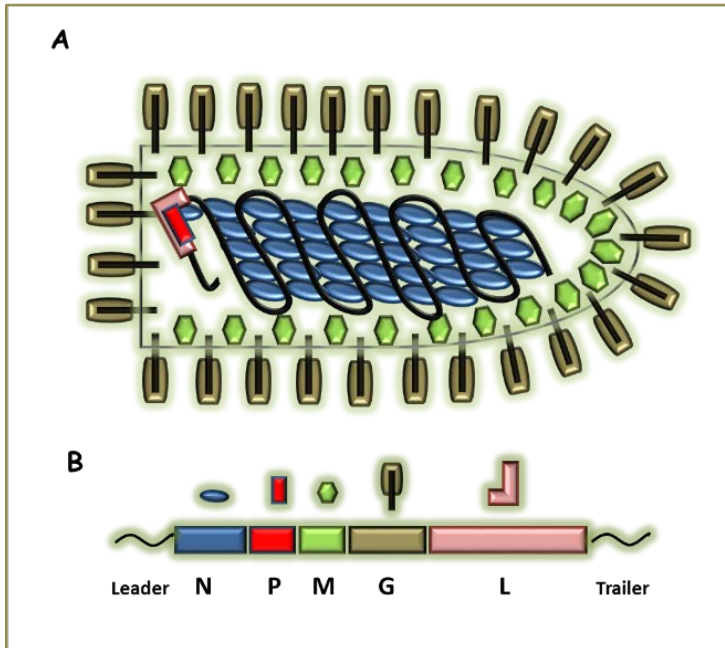
La proteína G es uno de los componentes de la envuelta y representa un tercio de la proteína total del virión. Es una proteína glicosilada con tres dominios: un ectodominio formado por 438 de los 504 aminoácidos que constituyen la proteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático. Al producirse la endocitosis de la partícula viral tras la adsorción se transporta directamente a los lisosomas y, una vez allí, en presencia de pH ácido (5.7-6.1), la proteína G sufre un cambio conformacional que le permite realizar la fusión de la membrana viral con la membrana citoplasmática, permitiendo la desencapsidación de la partícula viral. La proteína G una vez sintetizada, glicosilada y debidamente plegada en el aparato de Golgi, migra a la membrana de la célula (Reis *et al.* 2009). Esta proteína es la responsable de la adsorción del virus y por tanto el principal

determinante antigénico responsable del reconocimiento celular. Hasta no hace mucho, no se habían identificado preferencias por ningún receptor celular, uniéndose de fosfatidilserina de manera inespecífica, un componente universal de la membrana celular, lo que le hace capaz de infectar cualquier tipo de célula animal (Dietzschold *et al.* 1982; Morimoto *et al.* 1989; Reis *et al.* 2009). Sin embargo, Finkelshtein *et al.* (2013), recientemente, describen cómo el receptor de proteínas de baja densidad (LDLR) sirve como la mayor puerta de entrada de VSV en células humanas y de ratón.

La proteína N es el principal componente de la nucleocápside, se encuentra distribuida revistiendo completamente el genoma del virus, su función es conferir estabilidad y protección a las nuevas cadenas de ARN sintetizadas, además de regular el equilibrio entre transcripción y replicación. Las proteínas P y L constituyen básicamente la transcriptasa y replicasa viral, y la proteína M se encuentra pegada a la superficie externa de la nucleocápside del virus a modo de revestimiento. Se han descrito numerosas funciones asociadas a esta proteína, como la encapsulación, ensamblaje de la partícula viral y la salida del virus de la célula por un proceso de gemación, o la inhibición del transporte de mensajeros del núcleo al citoplasma en el hospedador (Reis *et al.* 2009; Rose *et al.* 2001).

Las regiones 3' y 5' del genoma se conocen como *Leader* (3') y *Trailer* (5'). Ambas regiones son no codificantes pero funcionalmente esenciales, estando implicadas en la regulación de la expresión génica y

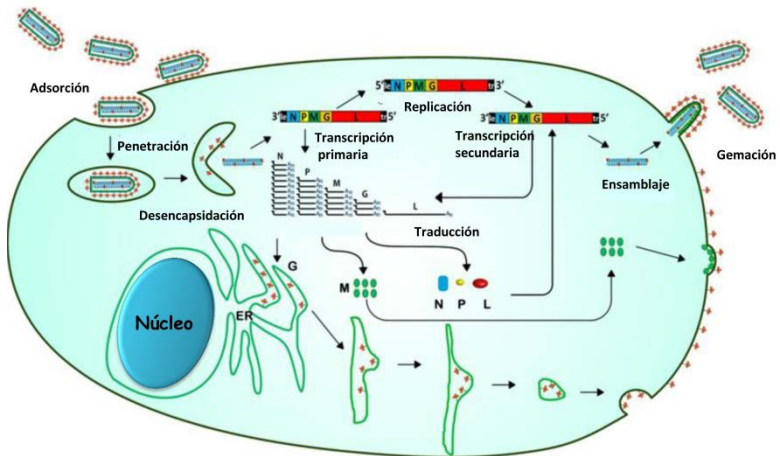
el balance entre transcripción y replicación. Se ha visto como mutaciones en cualquiera de esas regiones pueden tener efectos negativos en la eficacia biológica del virus (Bracho, 2003).



**Figura 2.** Organización genómica y estructura del virión de VSV. (A) Muestra cómo se encuentran estructuradas las distintas proteínas junto con el ARN genómico. (B) Cadena de polaridad positiva o antigenoma conteniendo las cinco proteínas y las regiones no codificantes *Trailer* y *Leader*.



El ciclo de replicación de VSV es el típico de la mayoría de virus de ARN de polaridad negativa. Se produce la adsorción a la membrana de la célula, el virus penetra y se desencapsida eliminándose la envuelta. A continuación, la proteína G cataliza la fusión de la membrana celular con la membrana del virión, liberándose el genoma viral en el citoplasma. El ARN de polaridad negativa sirve de molde para la transcripción que se lleva a cabo por la polimerasa del virus, produciendo inicialmente un ARN líder de 48 nucleótidos, seguido de los cinco mensajeros que codificarán para las cinco proteínas virales, siempre en el mismo orden, N, P, M, G, L. Una vez sintetizadas las proteínas desde el transcrito primario, el genoma viral pasa a ser replicado produciendo ARN de polaridad positiva o antígeno, que servirá de molde para la síntesis del genoma que va a ser encapsidado (de polaridad negativa). La encapsidación del genoma se da al mismo tiempo que su replicación (Lyles *et al.* 2006) (Figura 3). La proteína M está implicada en la inducción de apoptosis que lleva a la muerte celular (Kopecky *et al.* 2001).



**Figura 3.** Ciclo de infección de VSV. Adaptación de la Figura de Jianrong Li and Yu Zhang (Li *et al.* 2012).

Los eventos de adsorción, penetración, desencapsidación y transcripción primaria tienen lugar durante las primeras horas post-infección. La replicación, transcripción secundaria y ensamblaje se dan más tardíamente, se calcula que entre las 10-12 horas post-infección. La duración de un ciclo completo de infección se encuentra por tanto entre 10-12 horas, aproximadamente (Lyles *et al.* 2006).

Como veremos después, VSV no solamente es un virus modelo de polaridad negativa, sino que en los últimos años se está investigando en gran medida su uso aplicado, en viroterapia contra el cáncer (Lichty *et al.* 2004; Parato *et al.* 2005; Bell *et al.* 2014).

## 2. Cáncer: una batalla pendiente

### 2.1 Biología del cáncer

El equilibrio entre proliferación y muerte de una célula eucariota se da bajo un conjunto de sucesos llamado ciclo celular. El cáncer es la consecuencia de una desregulación en el ciclo celular, donde las células proliferan de manera descontrolada rompiéndose el equilibrio entre proliferación y muerte. El origen de este desequilibrio es exclusivamente genético. La acumulación de mutaciones en el ADN tiene como consecuencia la transformación de una célula sana en una célula tumoral, pudiendo ser los desencadenantes factores hereditarios, ambientales o una mezcla de ambos (Igney *et al.* 2002; Gerl *et al.* 2005).

Los cambios genéticos que pueden dar lugar a la generación de un tumor son aquellos que suceden en tres tipos de genes: los proto-oncogenes, los genes supresores de tumores y los genes de reparación del ADN. Los proto-oncogenes son genes que codifican para proteínas que activan directa o indirectamente la proliferación celular: RAS, c-myc, c-fos son algunos ejemplos (Todd *et al.* 1999). Los genes supresores de tumores son los encargados de regular la proliferación celular. Los más conocidos son p53 y el gen del retinoblastoma (Rb) (Hollstein *et al.* 1991). La velocidad de crecimiento de una célula es el resultado de la acción simultánea de ambos tipos de genes, y

mutaciones en cualquiera de estos genes pueden tener como resultado un crecimiento celular descontrolado.

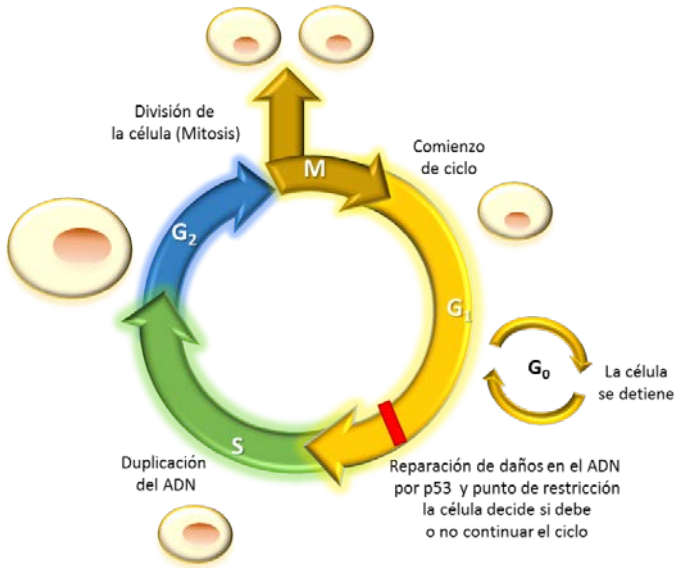
Los genes reparadores del ADN no contribuyen directamente al crecimiento ni la proliferación celular. Estos genes son los encargados de reparar los errores que se producen espontáneamente en el ADN durante la duplicación de la célula, como consecuencia de la exposición a mutágenos químicos o radiaciones. La aparición de mutaciones que inhabiliten estos genes tendrá como consecuencia la aparición de mutaciones en el genoma de la célula y podrán tener efectos cancerígenos cuando estas mutaciones se encuentren en proto-oncogenes o genes supresores de tumores.

## **2.2 P53 y sus implicaciones en el proceso tumoral**

Más de la mitad de células tumorales tienen mutaciones que afectan a la funcionalidad del gen supresor de tumores p53 (Hainaut *et al.* 2000; Hollstein *et al.* 1991; Hollstein *et al.* 1998). Como ejemplo de la relación entre alteraciones en el gen p53 y el proceso tumoral se encuentra el síndrome de Li-Fraumeni. Las personas que heredan un alelo mutado del gen son pacientes con alto riesgo de generar tumores malignos. Si se produce la inactivación del segundo alelo (las mutaciones en los genes supresores son recesivas), manifiestan el síndrome y desarrollan

tumores malignos de todo tipo, entre ellos leucemias, sarcomas, cáncer de mama y tumores cerebrales (Malkin 2011).

P53 es un factor de transcripción encargado de evitar la proliferación de una célula cuando presenta daños en el ADN. Una célula en su estado normal presenta niveles bajos de P53, sin embargo, la exposición a mutágenos o a radiaciones ultravioleta estimulan la producción de P53 activando la transcripción de sus genes diana, encargados de detener el ciclo en fase G1 (Figura 4). Si al detenerse el ciclo puede efectuarse correctamente la reparación del ADN, la célula podrá continuar el ciclo hacia la fase S completándose la división de la célula. Si por el contrario, la reparación no es posible, la célula entrará en apoptosis produciéndose la muerte celular. Cuando P53 está dañada, la célula continuará el ciclo celular sin ser reparada, acumulando mutaciones en su genoma, la división continuada de una célula genéticamente dañada desemboca en una masa celular o tumor.



**Figura 4. Ciclo celular.** Representación gráfica de las diferentes etapas por las que pasa la célula durante su duplicación. Al final de la fase G<sub>1</sub>, después de la comprobación del estado de la célula, P53 permite que continúe su división o entra en apoptosis produciéndose la muerte de la célula.

## 2.3 Desregulación de la cascada del interferón (IFN) en células tumorales

El IFN está constituido por una familia de citoquinas pleiotrópicas secretadas por la célula como parte de su respuesta inmune innata. Cuando se produce la infección de una célula, como respuesta, se

secreta IFN que se une a receptores específicos desencadenando mecanismos antivirales, inmuno-moduladores y apoptóticos, entre otros. El papel de la desregulación en la secreción de IFN en células tumorales no está claro (Katsoulidis *et al.* 2010). Sin embargo, ratones con defectos en los receptores para el IFN desarrollan tumores con mayor facilidad que aquellos que presentan receptores normales (Shankaran *et al.* 2001; Kaplan *et al.* 1998; Dunn *et al.* 2005).

## **2.4 Tratamientos contra el cáncer: viroterapia**

En la actualidad, los tratamientos contra el cáncer son multidisciplinarios. La necesidad de la erradicación completa de todas las células tumorales para prevenir una recidiva es una batalla complicada en la que deben entrar en juego todas las armas de las que se dispone. La cirugía temprana es hasta ahora el método con mayor tasa de curación en tumores sólidos, hasta un 50% de los pacientes a los que se les aplica cirugía en un tumor primario consiguen superar la enfermedad. Sin embargo, la aparición de metástasis en el otro 50% lleva implícita la necesidad de complementar la cirugía con otras terapias.

Los tratamientos alternativos y/o complementarios a la cirugía de los que se dispone hasta la fecha son la radioterapia y la quimioterapia. Se trata de tratamientos agresivos que actúan indiscriminadamente produciendo una gran cantidad de efectos adversos que comprometen

la supervivencia del paciente. La necesidad de conseguir terapias dirigidas a bloquear específicamente el tumor ha acelerado la investigación en este campo en los últimos años, produciéndose grandes avances. En la actualidad, se encuentra en desarrollo un sector de nuevos tratamientos, tratamientos biológicos, que comprenden un grupo de terapias dirigidas específicamente a controlar el tumor, con un perfil de efectos secundarios más tolerable. Estos nuevos tratamientos incluyen citoquinas, anticuerpos monoclonales, anti-angiogénicos, vacunas que estimulan el sistema inmunitario a modo de inmunoterapia, la terapia génica y los virus oncolíticos. Los virus oncolíticos son una aproximación terapéutica en el tratamiento contra el cáncer basada en el uso de virus capaces de replicarse y lisar selectivamente las células tumorales ([www.cancer.gov/](http://www.cancer.gov/); *cancer therapy*).

## **3. Virus oncolíticos**

### **3.1 Historia de los virus oncolíticos**

La relación entre virus y cáncer data de hace más de un siglo, cuando fortuitamente se observó en repetidas ocasiones cómo pacientes enfermos de cáncer presentaban periodos de mejoría en la enfermedad durante un proceso viral. El primer documento acerca de estas observaciones data de 1904 (Dock 1904) , donde se reporta el



caso de una enferma de leucemia afectada por una infección de las vías respiratorias altas, presumiblemente gripe, en la que se observa una remisión temporal de la leucemia. Posteriormente, otros casos fueron registrados en enfermos de leucemia u otro tipo de linfomas en los que se observaba una mejoría durante la infección por virus como la gripe, sarampión o hepatitis.

Hacia 1940, hay constancia de ensayos pre-clínicos en ratón usando cepas virales murinas salvajes contra tumores alogénicos, mostrando evidencias de actividad antineoplásica, pero también, una elevada toxicidad que los hacía letales (Moore 1951). Debido a la falta de metodología para la experimentación en este campo, el estudio de los virus oncolíticos se vio languidecido durante décadas. Sin embargo, la implantación del cultivo celular entre 1940-1950 (Hsiung 1989) y sobre todo el auge de biología molecular sobre 1970, hace que el estudio de esta terapia se haya retomado en las últimas dos décadas.

En la actualidad, son numerosos los grupos de investigación dedicados a este campo, centrados principalmente en la mejora de la selectividad y la eficacia de las terapias virales, sin embargo, muy pocos son los que llegan a fase clínica.

Generalmente, para que un virus oncolítico llegue a ser ensayado en fase clínica debe reunir las siguientes características: (1) debe poder darse la difusión eficiente del virus toda la zona neoplásica; (2) debe producirse un equilibrio entre la propagación del virus y la proliferación

de las células tumorales que con el tiempo favorezca la propagación viral por encima de la proliferación celular; (3) a ser posible, el paciente debe carecer de inmunidad adquirida contra ese virus, para evitar el aclaramiento viral por parte del sistema inmunitario; (4) la vía de administración ha de ser preferentemente no parenteral, para evitar el secuestro temprano de las partículas virales por parte del sistema fagocítico procedente de hígado y bazo. Sumado a lo anterior, otro aspecto importante es la estabilidad genética de las células tumorales a tratar para evitar una rápida resistencia a la terapia. En resumen, a pesar de ser cientos los virus oncolíticos en desarrollo, solamente unos pocos van a poder llegar a fase clínica, dónde podrá comprobarse su eficacia y seguridad en pacientes de cáncer (Pol *et al.* 2014).

Actualmente, se encuentran en diferentes estadios de ensayos clínicos versiones modificadas del adenovirus, el virus del herpes simple, el virus de la viruela, el virus cocxsackie, el poliovirus, el parvovirus, retrovirus, reovirus y VSV entre otros (Sze *et al.* 2013; Russell *et al.* 2012; Pol *et al.* 2014). En la Tabla 1 podemos encontrar la última actualización publicada (Junio 2014) del estado de los ensayos clínicos para los diferentes virus. En la actualidad, solamente China ha aprobado el uso de un virus oncolítico en pacientes de cáncer, Oncorine© (H101), un adenovirus indicado en el cáncer de cabeza y cuello. Los resultados obtenidos en pacientes hasta el momento son esperanzadores, pues su aplicación combinada con el tratamiento de quimioterapia habitual ha doblado la eficacia en una respuesta a corto

plazo, comparado con el tratamiento con quimioterapia sola (Garber 2006; Guo *et al.* 2006).

**Tabla 1.** Ensayos clínicos para la evaluación de eficacia y seguridad de la terapia oncolítica en pacientes con cáncer (Datos entre marzo de 2013 y junio 2014)

Virus	Nombre	Indicaciones	Fase clínica	Vía admón.	Tratamiento	Ref <sup>(1)</sup>
Adenovirus	CG0070	Carcinoma vejiga	I	Intravesical	Solo	NCT00109655
	ColoAd1	Carcinoma colorectal	I	i.t. ó i.v.	Solo	NCT02053220
		Carcinoma ovario	I/II	i.p.	Solo	NCT02028117
		Tumores sólidos	I/II	i.v.	Solo	NCT02028442
	DNX2401	Glioblastoma	I	i.t.	Con temozolomida y/o cirugía	NCT01956734
	ICOVIR-5	Melanoma	I	i.v.	Solo	NCT01864759
Tumores sólidos		I/II	i.p. (via MSCs)	Solo	NCT01844661	
VCN-01	Cáncer de páncreas Tumores sólidos	I	i.t.	Con gemcitabina	NCT02045589	
		I	i.v.	Con gemcitabina	NCT02045602	
<b>Virus Coxsackie</b>	CVA21	Tumores sólidos	I	i.v.	Solo	NCT02043665
<b>Herpes simple</b>	HSV-1716	Glioma	I	i.t.	Con dexametasona	NCT02031965
	T-vec	Melanoma	II	i.t.	Solo	NCT02014441
<b>Virus del Sarampión</b>	MV-NIS	Cabeza/cuello	I	i.t.	Solo	NCT01846091
		Carcinoma ovario	I/II	i.p. (via MSCs)	Solo Solo	NCT02068794
<b>Virus de la Viruela</b>	Pexa-Vec	Carcinoma ovario	II	i.v.	Solo	NCT02017678
<b>Retrovirus</b>	Toca 511	Tumores de cerebro	I	i.v.	Con 5-FC	NCT01985256

VSV-hIFN $\beta$	IFN beta	Hepatocarcinoma	I	i.t.	sólo	NCT01628640
------------------	----------	-----------------	---	------	------	-------------

Abreviaciones: 5-FC (5-fluorocitosina); i.a. (intra-arterial); i.p. (intra-peritoneal); i.t (intratumoral); i.v. (intra-venosa), MSC (*mesenchymal stem cell*), *Vía admón (Vía administración)*. Ref (Referencias). (1) <https://clinicaltrials.gov>

Esta tabla es una modificación de la tabla que aparece en el artículo Pol *et al.* 2014.

### 3.2 Aspectos fundamentales de un virus oncolítico.

Cuando un virus es considerado como potencialmente oncolítico, han de ser abordadas una serie de cuestiones básicas, como la eficacia, la seguridad (selectividad) y la posibilidad de cultivarlo a gran escala sin que se vea afectada ninguna de las características anteriores. Unos de los aspectos más críticos de la viroterapia es la seguridad. En estas últimas décadas han sido desarrolladas infinidad de estrategias en el intento de salvaguardar este aspecto sin que se viese afectada la eficacia. La ingeniería genética ha jugado un papel fundamental en el desarrollo de oncolíticos más seguros (selectivos) y eficaces.

La selectividad del virus ha sido abordada básicamente desde cinco estrategias diferentes: (1) a nivel de transducción, mediante modificaciones de las proteínas de superficie, implicando cambios importantes en la transducción de señales que permiten el reconocimiento selectivo de la célula tumoral (Ayala-Breton *et al.*

2012;Nanni *et al.* 2013); (2) a nivel de transcripción, usando promotores que se activan selectivamente en la célula diana (Wang *et al.* 2014); (3) a nivel de traducción, por inserción de microrregiones de unión de ARNs en regiones no-codificantes, permitiendo la infección únicamente en tejidos donde se expresen esos micro-ARNs (Sugio *et al.* 2011; Ylösmäki *et al.* 2013); (4) a nivel post-traducciona l introduciendo “dominios de desestabilización” en proteínas virales esenciales, que sólo serán estables en ciertos tejidos expuestos a agentes estabilizantes de manera natural o artificial (Banaszynski *et al.* 2008); (5) a nivel general, en el caso de algunas cepas virales capaces de crecer en células tumorales que presentan defectos en la expresión de su inmunidad humoral, manteniéndose atenuadas cuando esos mecanismos funcionan (Stojdl *et al.* 2003).

### **3.3 Dificultades y riesgos de la terapia con virus oncolíticos**

La viroterapia en cáncer encuentra algunos obstáculos difíciles de abordar que pueden restar eficacia a la terapia. Por un lado, obstáculos físicos como puede ser la anatomía del tumor. Los virus se propagan de manera fácil y rápida en una monocapa de células, sin embargo, un tumor es una masa sólida donde la difusión del virus puede ser más complicada. La administración junto con co-adyuvantes como péptidos o anticuerpos, o la modificación genética del virus para permitir una

mejor difusión en tumores, son actuales campos de estudios ( Zhou *et al.* 2014; Muik *et al.* 2014).

Por otro lado, se añaden obstáculos fisiológicos como la respuesta inmunitaria del organismo al producirse una infección. Sobre este aspecto podemos encontrar contradicciones. Algunos trabajos, muestran cómo la respuesta inmunitaria de la célula va a limitar la replicación viral en pacientes inmunocompetentes, viéndose reducida la efectividad de la terapia (Ikeda *et al.* 1999). Sin embargo, otros estudios en este campo presentan evidencias de que el efecto antineoplásico de los virus oncolíticos no tiene su base únicamente en la actividad citotóxica del virus, sino en la combinación de citotoxicidad viral y un aumento de la respuesta inmunitaria específica contra el tumor (Batenchuk *et al.* 2013; Toda *et al.* 1999). De hecho, algunos ensayos clínicos apoyan el uso de virus para activar una respuesta inmunitaria sistémica contra el tumor (Wallack *et al.* 1998).

La vía de administración del virus puede ser un factor clave en este desencuentro en los casos donde la respuesta inmunitaria antagonice la efectividad del virus. Una administración sistémica va a desencadenar una respuesta inmunitaria general inactivándolo rápidamente, mientras que la administración intratumoral podría ser una alternativa efectiva. No obstante, el tipo de administración va a depender en última instancia de la localización del tumor y, en algunos casos, debido a la situación anatómica del tumor, la administración intratumoral no va a ser posible. Dado que en este campo hay

divergencia de resultados y opiniones el papel del sistema inmunitario en la viroterapia antitumoral es un área de gran interés para muchos grupos en la investigación con virus oncolíticos.

Por otro lado la estabilidad genética del virus es un aspecto fundamental para la seguridad de la terapia desde el punto de vista de la producción del virus a gran escala para su uso en pacientes. El virus oncolítico ideal debe ser capaz de alcanzar títulos elevados que permitan su producción y purificación para su uso en humanos sin sufrir modificaciones genéticas. La continua replicación del virus bien en cultivos, bien en el propio organismo, va ligada a posibles cambios en el genoma viral que podrían aumentar su virulencia. A pesar de ser un campo de suma importancia, no existen estudios dedicados a observar el comportamiento del virus a nivel evolutivo y las posibles consecuencias de la replicación del virus a gran escala.

Otro fenómeno importante es la recombinación, fenómeno que puede darse tras una co-infección con virus evolutivamente cercanos. Como ejemplo, el virus del herpes simple (HSV) es un virus bastante común, así como agresivo en pacientes inmunodeprimidos, cuyo genoma yace latente en una gran parte de la población, causando problemas de diversa índole cuando se produce su activación. El virus oncolítico HSV-1716, en fase clínica contra gliomas, tiene una delección que inactiva el gen ICP 34.5, responsable de su virulencia en células del sistema nervioso. Si un paciente crónico para HSV fuera tratado con el virus



oncolítico HSV-1716, este virus inicialmente no virulento podría recombinar con el virus latente recuperando su virulencia.

### **3.4 Propiedades oncolíticas de VSV**

Tras una infección viral, la célula infectada pone en funcionamiento sus mecanismos de defensa, entre ellos, la secreción de interferón (IFN) (Muller 1994). Sin embargo, en células tumorales esta función se encuentra generalmente dañada (Critchley-Thorne *et al.* 2009). VSV es un virus extremadamente sensible a la presencia de IFN. Cultivos celulares o ratones deficientes en genes relacionados con la síntesis de IFN son notablemente más susceptibles a la infección por VSV, pues la presencia de IFN inhibe fuertemente la replicación del virus, como describen Balachadran *et al.* (2000) en el primer artículo donde se pone de manifiesto las propiedades oncolíticas de VSV. Esa habilidad de infectar las células tumorales con mucha más eficacia que las sanas debido a la secreción de IFN por estas últimas ha sido puesta de manifiesto también en cultivos de células primarias procedentes de pacientes (Dummer *et al.* 2001). Por otro lado, VSV es capaz de infectar prácticamente cualquier tipo celular pudiendo extenderse su estudio hacia un amplio grupo de tumores (Barber 2004).

Esas características naturales de VSV han generado entusiasmo en su desarrollo y estudio como virus oncolítico. Como consecuencia, existen

numerosos trabajos publicados en un intento de mejorar las habilidades oncolíticas de VSV. Por ejemplo, la delección de la metionina 51 de la proteína M ha demostrado aumentar la selectividad de VSV al eliminar la capacidad del virus de bloquear el IFN, resultando un fenotipo atenuado en células normales (Stojdl *et al.* 2003). Una estrategia similar consiste en introducir en el virus el gen IFN  $\beta$  (VSV-IFN  $\beta$ ) de manera que éste sea capaz de replicar normalmente en células no competentes para la respuesta a IFN y sin embargo, no lo haga en células donde la respuesta a IFN es normal por activación de la síntesis de IFN vía autocrina/paracrina (Obuchi *et al.* 2003).

Otras de las ventajas de VSV como virus oncolítico es que se trata de un virus de ARN, ya que algunos grupos sugieren que los virus de ARN son mejores como virus oncolíticos que los virus de ADN por diversas razones (Giedlin *et al.* 2003). Por un lado, pueden producirse en grandes cantidades en biorreactores o en algunas líneas celulares de mamíferos, aspecto muy importante en la en la producción de virus a gran escala para su uso como terapia. Se ha demostrado que un litro de sobrenadante de un cultivo de VSV es suficiente para vacunar a un millón de personas ( Rose *et al.* 2001). Por otro, hasta la fecha no hay datos clínicos acerca de infecciones por VSV en humanos, por lo que será muy raro encontrar inmunidad anti-VSV previa al tratamiento. Como VSV replica rápidamente, probablemente será capaz de actuar contra el tumor antes de que el paciente pueda desarrollar inmunidad contra éste.

### 3.4.1. El virus oncolítico VSV-M $\Delta$ 51

El virus oncolítico ideal, como ya se ha mencionado, ha de ser selectivo. La mayoría de células tumorales presentan defectos en la síntesis de IFN, por lo que es de esperar que un virus que sea inhibido por la presencia de IFN replique bien en células tumorales que tengan dañada esta vía, pero no en células normales en presencia de IFN. Balachadran *et al.* (2000) mostraron que VSV es un virus extremadamente sensible a la presencia de IFN con potencial oncolítico. Stojdl *et al.* (2003), aprovechando esta característica, desarrollaron tres mutantes de la proteína M, concretamente el mutante M51R, el doble mutante V221F/S226R y el mutante M $\Delta$ 51. Posteriormente evaluaron su capacidad oncolítica, demostrando que la delección de la metionina 51 de la proteína M confiere al virus incapacidad para bloquear la síntesis de IFN, resultando un virus atenuado en células normales. La proteína M tiene entre sus funciones la de bloquear el transporte de mensajeros entre el núcleo y el citoplasma para inhibir la respuesta inmune del hospedador. La delección de la metionina 51 inhabilita esta función permitiendo que la respuesta antiviral de la célula sea efectiva. El virus VSV-M $\Delta$ 51 fue evaluado también *in vivo* observándose la reducción de tumores alogénicos en ratón tanto en inoculaciones intratumorales como sistémicas. El virus VSV-M $\Delta$ 51 será usado como virus oncolítico de referencia durante esta tesis.

### **3.5 Evolución experimental: un paso más en el desarrollo de nuevos tratamientos contra el cáncer.**

En la actualidad, la mayoría de esfuerzos en el desarrollo de virus oncolíticos se encuentran focalizados a resolver una cuestión concreta de la terapia, quedando en el aire otros aspectos que pueden restar sobretodo eficacia al tratamiento. El cáncer es una enfermedad compleja que abarca múltiples procesos de la célula. En un intento de abordar este problema algunos investigadores comenzaron a poner en práctica el uso de la evolución experimental en el desarrollo de virus oncolíticos. Sin embargo, actualmente son muy pocos los trabajos publicados en este campo, de hecho, sólo hay constancia de un virus oncolítico desarrollado mediante evolución experimental que se encuentre en fase clínica. Se trata de un Adenovirus (ColoAd1) que actualmente se encuentra en fase clínica I/II para carcinoma de ovario y carcinoma colorectal (Pol *et al.* 2014). El virus fue obtenido por pases seriados de evolución en células de cáncer de colon. Tras la evolución se observó un cambio de eficacia de 2-3 logaritmos respecto a virus ancestral no sólo en las células donde había sido evolucionado sino en células de carcinoma de colon en general, lo que demostró que el virus se había adaptado a características propias de ese tipo de tumor (Kuhn *et al.* 2008; Bauzon *et al.* 2012).

Otro trabajo, en el que aplicaron la evolución experimental al desarrollo de virus oncolíticos es el de Gao *et al.* (2006). En este trabajo

introdujeron mediante ingeniería genética varios cambios en el genoma de VSV en un intento de aumentar la selectividad del virus hacia células tumorales de cáncer de mama. En concreto, se añadió al virus un anticuerpo dirigido a un receptor específico de ese tipo de celular, encontrándose como problema que, tras la manipulación del genoma viral el virus apenas replicaba en las células diana. Sin embargo, tras una serie de pases seriados del virus en esas células, observaron cómo se incrementaba notablemente su capacidad replicativa (Gao *et al.* 2006).

Un ejemplo más es el de Wollmann *et al.* (Wollmann *et al.* 2005), en el que sometieron a VSV a pases seriados en células humanas de glioblastoma, consiguiendo un incremento de la selectividad del virus hacia células de glioblastoma versus células sanas. Además, su efecto no se restringió solamente a las células donde fue evolucionado, sino que presentó capacidad oncolítica frente a otras líneas celulares de glioblastoma con perfiles genéticos distintos a las células donde fue evolucionado. Estos resultados señalan que la adaptación de virus a células tumorales puede ser considerada eficaz incluso en tumores con elevada heterogeneidad genética como ocurre en el glioblastoma.

## 4. Descripción del sistema experimental

Durante esta tesis, la evolución experimental va a ser nuestra herramienta de trabajo en el desarrollo de virus con capacidad oncolítica y en el control de la estabilidad/variabilidad de un virus oncolítico. Demostraremos que mediante esta aproximación podemos abordar las tres cuestiones básicas en el desarrollo de un virus oncolítico: seguridad, eficacia y estabilidad.

En la primera parte, hemos seleccionado 15 mutantes a partir de trabajos previos de evolución experimental con VSV en cultivos de células tumorales. Posteriormente, hemos introducido cada mutación singularmente en el genoma de VSV, obteniendo 15 mutantes simples, a continuación, hemos evaluado si alguno de esos mutantes mostraba propiedades oncolíticas. La mayoría de trabajos de evolución de VSV están hechos en líneas celulares tumorales ya que éstas son fáciles de propagar y mantener.

Nuestra hipótesis es que cuando un virus es evolucionado en una célula tumoral sufrirá adaptación a ese tipo de célula apareciendo en su genoma cambios responsables de la adaptación, que probablemente confieran desventajas en otros tipos celulares. Por tanto, podríamos pensar que (i) los cambios genéticos acontecidos en una célula tumoral podrán ser favorables para el virus también en otras células tumorales; (ii) tenderán a ser costosos en células normales; (iii) sus efectos son

podrán o no ser reproducibles de manera aislada, en función de la importancia de la epistasia.

En la segunda parte, hemos desarrollado un sistema de experimentación en el que evolucionamos VSV en células deficientes en el gen supresor de tumores p53 (no funcional en la mayoría de células tumorales), permitiendo por tanto el crecimiento continuado del virus en un “ambiente celular” parecido al tumoral. Nuestra hipótesis es que tras la evolución obtendremos un virus adaptado a ese nuevo ambiente y por tanto, con mejor eficacia que el virus ancestral en cualquier célula deficiente en P53. Además, el virus evolucionado podría pagar un coste en términos de eficacia, replicando peor en células competentes para dicho gen, devolviéndonos por tanto un virus más selectivo y eficaz. Por otro lado, con la intención de detectar eventos de evolución paralela que faciliten la identificación de los cambios genéticos asociadas a la adaptación se llevaron cuatro linajes, réplicas de evolución, en paralelo.

Por último, el tercer objetivo abordado es la comprobación de la estabilidad/ variabilidad de un virus oncolítico. Para ello, hemos sometido a 20 pases de evolución en células no tumorales, competentes para la síntesis de IFN, a un virus de referencia en el campo de los oncolíticos, concretamente VSV-MΔ51-GFP (Green Fluorescence Protein, GFP). Nuestra hipótesis es, que tras la evolución bajo presión selectiva (presencia IFN), encontraremos una reversión del fenotipo atenuado que presenta dicho virus en este tipo celular,

probablemente por la aparición de mutaciones compensatorias de la deleción MΔ51, confiriendo al virus de nuevo la capacidad de bloquear la síntesis de IFN y resultando un virus menos selectivo.



---

**OBJETIVOS**



1. Selección y desarrollo de un panel de mutantes simples y posterior cribado para la determinación de su capacidad oncolítica.
2. Desarrollo de un virus oncolítico mediante evolución experimental.
3. Determinación experimental de la estabilidad genético-evolutiva de un virus oncolítico.



## **METODOLOGÍA**

---



# 1. Virus y células

## 1.1 Cultivos celulares

**Líneas celulares inmortalizadas:** Las líneas celulares BHK-21 (fibroblastos de riñón de hámster), CT-26 (carcinoma de colon de ratón), 4T1 (cáncer de mama de ratón), A549 (carcinoma de pulmón humano), MRC5 (fibroblastos embrionarios de pulmón humano), HeLa (carcinoma de cérvix humano) y Vero (fibroblastos de riñón de mono) son todas procedentes de la ATCC (American Type Culture Collection) ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)) mientras que las células MCF7 (cáncer de mama humano) fueron cedidas por el servicio de cultivos celulares del hospital clínico de Valencia.

**Cultivos primarios de ratón:** MEFs p53KO (fibroblastos embrionarios de ratón deficientes en el gen p53), MEFs *wt* (fibroblastos embrionarios de ratón). Ambas son células procedentes de ratones de la cepa C57BL6, aisladas según el protocolo descrito en (Palmero *et al.* 2001) y cedidas por la Dra. Carmen Rivas (Universidad de Santiago de Compostela).

Todas las células fueron cultivadas en medio DMEM suplementado por un 10% de FBS, 1% penicilina-estreptomicina en condiciones controladas de humedad relativa (95%), temperatura (37°C) y CO<sub>2</sub> (5%).

## 1.2 Cepas virales

***Clon infeccioso del virus de la estomatitis vesicular (rVSV)*** originalmente creado por el Dr. Whelan (Whelan *et al.* 1995)

VSV ***MARM***, derivado del clon infeccioso de VSV, es idéntico al clon infeccioso original de Whelan a excepción de un cambio nucleotídico A>C en la posición 3853 del genoma, que le confiere resistencia a un anticuerpo monoclonal contra un epítipo de la proteína G del virus (Vandepol 1986). Creado por Sanjuán *et al.* (2004).

***VSV-Δ51-GFP***, cedido por el Dr. John Bell del *Ottawa Hospital Research Institute* en Ottawa (Canadá), este virus presenta una delección del codón 51 de la proteína M y GFP como gen reportero entre las proteínas G y L (Stojdl *et al.* 2003)

***Vaccinia virus vTF7-3*** procedente de la ATCC, este virus expresa la RNA polimerasa del bacteriófago T7, que servirá para transcribir los ADN introducidos en la célula por transfección durante el protocolo de mutagénesis dirigida.



## **2. Infecciones**

### **2.1 Infecciones en medio líquido**

Las infecciones en medio líquido se realizan sobre una monocapa de células confluyente en el tipo celular donde se desee obtener la cepa viral. Se retira el medio de cultivo y se añade una pequeña cantidad del virus (suficiente para cubrir la monocapa) a la multiplicidad de infección (MOI) deseada, se incuba a 37°C durante 45-60 min (periodo de adsorción del virus), posteriormente, se añade medio líquido de crecimiento con 2% suero bovino fetal (FBS) y 100 µg/mL de penicilina-estreptomicina (P-S). Transcurrido el tiempo de incubación deseado se procede a alicuotar y congelar el sobrenadante a -80°C.

### **2.2 Titulación viral por plaqueo en medio de agar semisólido**

Para la titulación viral se realizan diferentes diluciones y se procede a la infección de una monocapa confluyente de células BHK-21, durante 45 min, tras el cual se añade medio de cultivo de agar semisólido a una concentración de 0.5% en DMEM con 2% de FBS y 100 µg/mL P-S. Transcurridas 24h se procede a la fijación de las células con formaldehído 2% y se tiñen con cristal violeta (2 % cristal violeta en

formaldehído 2%). Los títulos vienen dados en (PFU (unidades formadoras de calvas.)/mL.

### 3. Evolución experimental

El protocolo de evolución experimental consiste en la inoculación del cultivo celular con el virus a MOI 0.1 y su posterior recogida a un tiempo determinado para repetir la infección de nuevo.

Las células fueron sembradas 24 h antes de la infección un total de  $10^5$  células por pocillo en placas de 24 pocillos, para llevar a cabo la infección se retira el medio y se inocula el pocillo con 50  $\mu$ L de medio que contiene  $10^4$  PFU. Tras una hora de incubación a 37°C, se añade medio de cultivo nuevo y se incuban el tiempo necesario hasta que el título viral alcanza su máximo (determinado previamente mediante una curva de crecimiento). Transcurridas las 24 h post infección (hpi) se recogen los sobrenadantes virales en diversas alícuotas, para su conservación a -80°C y para la re-infección de cultivos frescos. Dicho procedimiento se repite durante un número determinado de pases y se llevan en paralelo al menos tres réplicas independientes (“linajes de evolución”).

En la evolución del virus en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs), al tratarse de un cultivo primario los cultivos de MEFs se reponían por cultivos jóvenes al alcanzar los 14 pases.

Durante el proceso de evolución cada pase ha sido titulado mediante plaqueo del virus en medio de agar semisólido en células BHK-21 según los protocolos descritos en y cada infección ajustada según el título obtenido para obtener una MOI de 0.1 en cada pase.

## 4. Determinación de la eficacia viral

### 4.1 Ensayos de competencia

La variación de las frecuencias de dos tipos virales en un ensayo de competencia nos proporciona su eficacia relativa en esas condiciones. Para realizar este tipo de ensayo uno de los virus ha de presentar un marcador fenotípico o genético, de manera que los competidores puedan diferenciarse. En este caso, el virus competidor será el clon infeccioso MARM resistente a un anticuerpo monoclonal (Sanjuán *et al.* 2004).

El ensayo de competencia consiste en la inoculación de una mezcla de partículas virales del competidor y el virus a evaluar en proporciones conocidas (normalmente 1:1), tras lo cual se recoge tanto el inóculo inicial ( $t_0$ ), como los sobrenadantes tras 24h ( $t_{24}$ ) o el tiempo deseado, de manera que pueda determinarse el cambio en la proporción de cada virus. La eficacia puede cuantificarse como  $W = \log (R_{24}/R_0)$  y el nivel de

adaptación de cada virus vendrá determinado por ese cambio de eficacia respecto al ancestro.

## 4.2 Curvas de crecimiento viral

Para la determinación del tiempo necesario para alcanzar el máximo título viral se realizaron curvas de crecimiento. Se infectaron monocapas confluentes de células con aproximadamente  $5 \times 10^4$  células/pocillo, en placas de 24 pocillos, siguiendo el protocolo de infección en medio líquido. A diferentes tiempos post-infección se recogieron alícuotas del medio de cultivo para la posterior determinación del título viral mediante plaqueo en medio semisólido en BHK-21. La curva de crecimiento viene representada por el título del virus (*PFU/mL*) a diferentes tiempos.

## 5. Citotoxicidad

### 5.1 Ensayo de viabilidad celular a MOI alta

Para determinar la citotoxicidad de los virus evolucionados frente al ancestro usamos un ensayo que mide actividad mitocondrial denominado MTS.

El ensayo del MTS se basa en el empleo del compuesto *MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-*

*2H-tetrazolium*) y PMS (*phenazinemethosulfate*) (Promega). Las células vivas y metabólicamente activas son capaces de reducir el MTS a formazano, un producto soluble en el medio de cultivo, produciéndose una reacción colorimétrica. La absorbancia del formazano puede medirse a 490nm y es directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo (Berridge *et al.* 2005)

Para la realización del ensayo las células se tripsinizaron y re-suspendieron en medio fresco  $10^5$  células/mL, se sembraron 100  $\mu$ L de células/pocillo en placas de 96 pocillos, posteriormente, se inocularon con 10  $\mu$ L de los virus a testar a MOI 3PFU/célula. El uso de esa MOI asegura que aproximadamente el 95% de las células van a ser infectadas. La viabilidad celular se determinó 18 hpi, añadiendo a cada pocillo 20  $\mu$ L de la mezcla de reactivos MTS/PMS (20:1). La reacción se incubó 3 h a 37°C y posteriormente, se midió la absorbancia a 490 nm usando un lector de placas Multiskan™ FC platereader (ThermoScientific).

En este ensayo se pretende estimar el efecto citotóxico del virus independientemente de la velocidad de crecimiento del virus, por ello se eligen una MOI y un tiempo de incubación que sólo permitan un ciclo de infección. Los valores obtenidos se expresan relativos a un control no infectado.

## 5.2 Concentración efectiva media (EC<sub>50</sub>)

La concentración efectiva media (EC<sub>50</sub>) es la cantidad de virus necesarios para matar a la mitad de las células y se expresa como PFU por célula, es decir en unidades de MOI. Para ello, las células fueron tripsinizadas y re-suspendidas en medio fresco a una densidad de 10<sup>5</sup> células/mL, sembrados 100 µL de células/pocillo en placas de 96 pocillos y éstas inocularon con 10 µL del virus a MOI variable (10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 y 0 PFU/célula).

Transcurridas 72 hpi se añadió Alamar Blue (Resazurina), un indicador del metabolismo celular. Las células metabólicamente competentes reducen la resazurina a resofurina, capaz de emitir fluorescencia a 590nm cuando es excitado a 560 nm. Tras dos horas de incubación se cuantificó la fluorescencia emitida con un el fluorímetro POLARstar Omega (BMG Labtech). Se calculó la EC50 según el modelo de regresión

$$V = \frac{1 - V_{min}}{1 + \left(\frac{MOI}{EC_{50}}\right)^{-h}}$$

Donde  $V_{min}$  es el valor de viabilidad mínimo observado y  $h$  la tasa máxima de viabilidad perdida.

## 6. Secuenciación y análisis de secuencias

La secuenciación de los genomas virales nos proporciona la pista sobre las bases moleculares del proceso adaptativo. Para la secuenciación se usó el RNA viral procedente del último pase de la evolución experimental. La extracción de RNA se realizó usando el kit comercial NucleoSpin RNA Virus (Macherey-Nagel), se amplificó el genoma completo del ancestro y los linajes evolucionados mediante RT-PCR usando las enzimas *AccuScript* (Agilent Technologies) y *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (ThermoScientific) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. La PCR se realizó dividiendo el genoma en 4 fragmentos (Tabla 2), las condiciones de PCR pueden encontrarse puede encontrarse en la información suplementaria (Anexo 1). Las PCRs fueron purificadas por columna con *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche).

En la secuenciación de los extremos virales se concentró el virus aproximadamente 5x por columna (Amicon Ultra 15 100KDA; Millipore), la extracción de RNA se realizó con TRI Reagent (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se ligaron los extremos virales usando *T4 RNA Ligase I* (NEB Ref. M0204S) durante 2 ha 37°C y se amplificó mediante RT-PCR, con un cebador reverso en el *leader* del virus, RACE\_Rev 5'-GCAGGAAGTTTTGGAAGTATGACTGTG-3' y cebador directo en el *trailer* RACE\_FW 5'-CACAGGAATGATTGAATGGATCAATAG-3'. La reacción se

corrió en un gel de agarosa 2% se cortó y purificó la banda del tamaño esperado (324 nt) con el *Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit*.

Todas las reacciones fueron secuenciadas por el método de Sanger y los cromatogramas analizados con el programa Staden (<http://staden.sourceforge.net>).

**Tabla 2.** Cebadores para la amplificación del genoma de VSV en 4 fragmentos.

F <sup>a</sup>	SECUENCIA	ORIENTACIÓN <sup>b</sup>	POSICIÓN
1	5'-ACGAAGACAAACAAACCA-3'	D	1-18
1	5'-ACAAGTAGTGACCCATTT-3'	R	3312-3329
2	5'-GTCTTTTCTATCCCTATG-3'	D	3022-3039
2	5'-TGGGTCTAGTAAGTCGGGTA-3'	R	6096-6115
3	5'-TGGAGATAAATGGCATGAAC-3'	D	6052-6071
3	5'-TATAATGAGCGCCAGTTG-3'	R	9666-9683
4	5'-GTGGGGACAAGAGATAAAAC-3'	D	8737-8756
4	5'-ACGAAGACCACAAAACCAG-3'	R	11143-11161

<sup>a</sup>Fragmento (F), <sup>b</sup>Directo(D), Reverso (R)



## 7. Funcionalidad de una proteína

### 7.1 Ensayo de Western blot

Para la determinación de la funcionalidad de la proteína P53 se expusieron las células a radiación ultravioleta (UV) y se detectaron por Western blot tanto la proteína P53 como la expresada por su gen diana, P21. Para ello, se expusieron a una radiación UV de  $4\text{J/m}^2$  placas confluentes de células CT-26, 4T1 y Vero durante 0.2, 5 y 10 s, a las 16 h las células se lavaron dos veces con PBS frío y se recogieron en un tampón hipotónico conteniendo (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM KCl, 2 mM DTT, 1 mM Pefabloc, 2 mM sodium vanadate,  $4\ \mu\text{g/mL}$  pepstatin,  $4\ \mu\text{g/mL}$  leupeptin, and  $4\ \mu\text{g/mL}$  aprotinin), la solución se mantuvo 30 min en hielo, posteriormente se centrifugaron y el sobrenadante se alicuotó y conservó a  $-20^\circ\text{C}$ .

Las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. Cantidades idénticas de proteína fueron separadas por electroforesis en un gel de acrilamida desnaturante SDS-PAGE y electro-transferidas a una membrana de PDVF. Posteriormente, las membranas se bloquearon 1 h a temperatura ambiente con tampón de bloqueo (PBS 1x, 0.1% Tween 20 y 5% leche desnatada) y pasaron a incubarse 16 h con los anticuerpos anti-P21 (sc-397, Santa Cruz) y anti-P53 (sc-6243, Santa Cruz). Los anticuerpos se diluyeron 1:200 en el mismo tampón de

bloqueo. Transcurrido el tiempo de incubación se lavaron con PBST (PBS1x, 0.1% Tween 20) y se incubaron con el anticuerpo secundario HRP- anti-rabbit antibody (sc-2030, Santa Cruz) durante 1 h diluido 1:10.000. Se lavaron las membranas con PBST y se pasó a su detección con el kit de ECL (Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se usó la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa GAPDH (sc-32233, Santa Cruz) como control de carga.

## 8. Cuantificación de la secreción de IFN $\beta$

### 8.1 ELISA

Se realizaron infecciones en placa de 24 pocillos con las diferentes cepas virales a evaluar en células MRC5 a la MOI determinada para el experimento en concreto. Se recogieron los sobrenadantes tras el tiempo determinado para cada experimento y se diluyeron 1:5 para cuantificarse. La cuantificación se realizó con el kit Assay IFN- $\beta$  (*human interferon beta*, Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las infecciones se realizaron por triplicado.

### 8.2 RT-PCR cuantitativa a tiempo real

La cuantificación del mensajero del IFN- $\beta$  y el gen inducible por IFN MxA se realizó tras la infección de células MRC5 con las cepas virales a testar a una MOI de 3. Tras 8 h se lavaron las células 3 veces con PBS y

se añadió *TRI reagent* a la monocapa. La extracción se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se realizó la transcripción reversa del ARN con *Accuscript RT* (Agilent).

Para la PCR se usó *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystem). Las reacciones fueron llevadas a cabo en el equipo *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Life Technologies). Para cada muestra se amplifica también un gen de expresión ubicua que nos permite normalizar cada muestra, en este caso el gen escogido fue GAPDH. Se realizó una cuantificación relativa midiendo por tanto el cambio de expresión para cada virus relativo al virus de referencia. Los cebadores utilizados vienen descritos en la Tabla 3. El protocolo de PCR detallado puede encontrarse en la información suplementaria (Anexo 2).

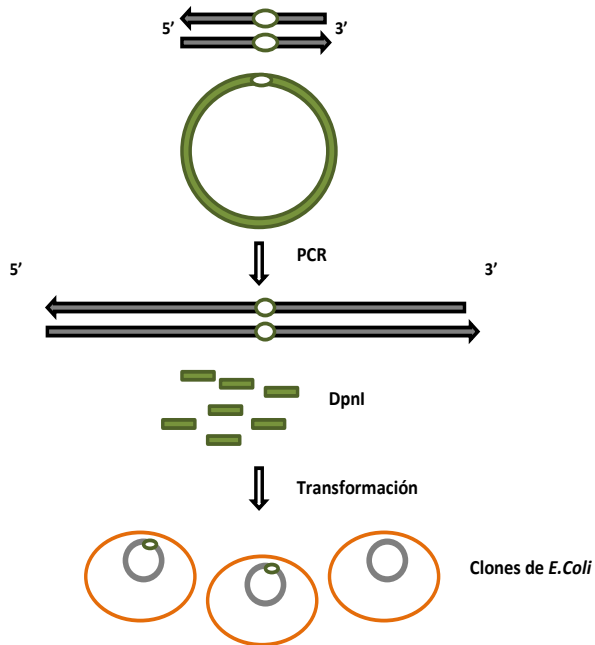
**Tabla 3.** Cebadores utilizados en la PCR cuantitativa.

GEN	SECUENCIA	ORIENTACIÓN <sup>a</sup>	[nM]
INF-β	5'-AGCACTGGCTGGAATGAGAC-3'	D	50
INF-β	5'-TCCTTGGCCTTCAGGTAATG-3'	R	300
MxA	5'-ATGGTTGTTTCCGAAGTGAC-3'	D	50
MxA	5'-TTTCTTCAGTTTCAGCACCAG-3'	R	300
GAPDH	5'-CATCTTCCAGGAGCGAGATC-3'	D	300
GAPDH	5'-GTTACACCCATGACGAACAT-3'	R	300

<sup>a</sup>Directo(D), Reverso (R)

## 9. Mutagénesis dirigida

La mutagénesis dirigida permite la introducción de mutaciones puntuales, así como la delección o introducción de nucleótidos en el genoma. Para la realización de esta técnica se diseñan dos cebadores específicos complementarios entre sí y que introducen el cambio a realizar. Posteriormente, se realiza una reacción de amplificación del DNA con *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific), partiendo de 150 ng del clon infeccioso MARM, donde cada cebador es extendido mediante la incorporación de nucleótidos por la polimerasa hasta completar el plásmido, obteniéndose amplicones completos del DNA. Las condiciones de PCR son 30s a 98°C 18 ciclos de 10s a 98°C y 8min a 72°C y 10 min 72°C de extensión final. Una vez terminado el proceso eliminamos el molde digiriendo con un enzima de restricción (DpnI) que corta sitios GATC metilados y transformamos en *Escherichia coli* (E.coli), mediante choque térmico (Figura 5). Se verificó la introducción del cambio deseado mediante la secuenciación de tres clones aislados para cada mutagénesis.



**Figura 5. Diagrama de la mutagénesis dirigida con cebadores complementarios.** Partimos de un DNA circular donde anillan los cebadores con el cambio a introducir, mediante una reacción de polimerización se alargarán hasta completar el DNA, eliminamos el molde por digestión múltiple con DpnI e introducimos en *E.coli* mediante transformación por choque térmico.

## 10. Transfección y recuperación del virus

A partir del DNA obtenido en la mutagénesis, se realiza una transfección en células BHK-21 para la recuperación de los virus mutantes.

Se infecta una monocapa de células BHK-21 a un 80% de confluencia con el virus vTF7-3 durante una hora a MOI 10, posteriormente, se realiza una co-transfección con el cDNA del plásmido mutado y los plásmidos P, L y N, que codifican para dichos genes de VSV (Whelan *et al.* 1995). La transfección se realiza con lipofectamina LTX (Lifetech) siguiendo las instrucciones del fabricante, 6 h después de la transfección se añade *arabinosilcitosina* a 25 mg/mL para inhibir la replicación del virus vTF7-3 y las reacciones se incuban durante 96 h a 37°C. Posteriormente, se recupera el sobrenadante y se filtra para eliminar el vTF7-3 y se conserva a -80°C.

Para verificar la presencia de partículas virales de VSV, se procede a un plaqueo en medio de agar semisólido. Los sobrenadantes positivos se amplificarán mediante una infección en medio líquido en células BHK-21.

## 11. Selección fenotípica de mutantes

### 11.1 Plaqueo de virus en diferentes tipos celulares

Se realizaron infecciones en diferentes líneas celulares tumorales y no tumorales, humanas y de ratón. Las infecciones se llevaron a cabo en placas de 6 pocillos en las que se inocularon aproximadamente 50 PFU por pocillo, sobre una monocapa totalmente confluyente de células y se realizó un plaqueo estándar. Para cada línea celular se tuvo en cuenta la eficiencia de plaqueo del virus *wt* basándose en la línea celular de referencia para este tipo de ensayos, células BHK-21(EP) (Tabla 4). La EP podría definirse como la capacidad que tiene un virus de formar calvas en un tipo celular con respecto a las células BHK-21.

**Tabla 4.** Tiempos de incubación y eficiencia del plaqueo en las diferentes líneas celulares.

Línea celular	Tiempo (h)	EP <sup>a</sup>
A549	24	1:5
MCF7	22	1:5
Hela	30	1:5
MEFs <i>wt</i>	24	1:10
MEFs <i>IFNrKO</i>	24	1:10
4T1	28	1:3

<sup>a</sup>EP (eficiencia de plaqueo , expresada como el cociente título:título en BHK-21.

## 11.2 Medición del tamaño de calva

Se tomaron fotografías de las monocapas y para las mediciones de las calvas se estandarizó un método automatizado con el programa de análisis de imagen *ImageJ*, que nos proporcionó el área de las calvas (Anexo 3).

## 12. Experimentos *in vivo*

Los experimentos *in vivo* nos permiten determinar la capacidad del virus para reducir un tumor pre-existente y para prolongar la supervivencia de los animales sin resultar tóxico para ellos. Los ensayos se realizaron en ratones de la cepa *Balb-c*.

Estos experimentos fueron llevados a cabo en el *Ottawa Hospital Research Institute en Ottawa* (Canadá) y todos los experimentos cumplieron con la Guía de cuidado y uso de animales de experimentación, publicada en el *Canadian Council on Animal Care*, así como la legislación para animales de experimentación que se aplica en la provincia de Ontario y en la Universidad de Ottawa siguiendo el protocolo número ME-222.

### 12.1 Purificación del virus

Los virus fueron amplificados a gran escala mediante infección en células Vero, hasta obtener aproximadamente 250 mL de sobrenadante viral que se concentró por ultra-centrifugación y posteriormente, se



purificó por gradiente en OptiPrep® (Iodixinol). Los virus concentrados y purificados fueron alicuotados y conservados a -80°C. La titulación de los virus se realizó por el método estándar de plaqueo en agar semisólido (Anexo 4).

## 12.2 Inducción del tumor en el ratón e infecciones

Se llevaron a cabo dos experimentos con líneas celulares diferentes: 4T1 y CT-26. Los ratones fueron aclimatados 4 días en el laboratorio de seguridad 2 (BL2) del animalario. Transcurrido el tiempo de aclimatación se inocularon de manera subcutánea unilateralmente en un flanco con  $3 \times 10^5$  células re-suspendidas en 100  $\mu\text{L}$  de PBS. Cuando el tumor alcanzó aproximadamente 200  $\text{mm}^3$  (7 días en el caso de las células 4T1 y 11 días para las CT-26) se procedió a inyectar intratumoral 50  $\mu\text{L}$  del virus purificado conteniendo  $10^8$  PFU. En el experimento con las células 4T1 la infección se repitió a los 7 días. Las inyecciones fueron realizadas sin sedación.

Los animales se examinaron cada dos días para registrar las medidas del tumor, además de buscar síntomas clínicos que pudieran ser causados por toxicidad viral, como pilo-erección, pérdida de peso, anorexia o comportamientos estereotípicos por afectación del sistema nervioso. Las medidas del tumor fueron tomadas con un calibre automático y el volumen del tumor viene dado por  $\text{Volumen} = (\text{Altura} \times (\text{anchura})^2)/2$ . Todos aquellos ratones cuyo tumor excedía los

1700mm<sup>3</sup> o presentaba síntomas de ulceración fueron sacrificados por requerimiento de la normativa.

**RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL**



- 1. Selección, desarrollo y cribado de un panel de mutantes simples para la determinación de su capacidad oncolítica en cultivos.**



## 1.1 Selección de mutantes

Está ampliamente demostrado que el crecimiento continuado de un virus en un determinado hospedador produce su adaptación a ese hospedador mediante cambios genotípicos (Buckling *et al.* 2009). Sin embargo, esa adaptación tiene un coste en términos de eficacia cuando se pone a crecer en otro hospedador distinto (Agudelo-Romero *et al.* 2008; Cuevas *et al.* 2009; Greene *et al.* 2005; Turner *et al.* 2000). Para este trabajo hemos seleccionado una serie de mutaciones (la mayoría en el gen M), procedentes de trabajos dónde VSV ha sido evolucionado en células con características tumorales y las hemos introducido singularmente en el genoma de VSV (Tabla 5). Consideramos BHK-21 con características tumorales por no ser competentes para la síntesis de IFN (Otsuki *et al.* 1979).

Nuestro objetivo, es detectar si alguno de esos cambios puntuales tiene un efecto oncolítico por el mero hecho de haber aparecido durante la adaptación del virus a células tumorales, siendo beneficiosa en células tumorales y deletérea en células normales. Para los experimentos llevados a cabo en este trabajo se ha usado como virus de referencia oncolítico el virus MΔ51 generado en nuestro laboratorio mediante mutagénesis dirigida para eliminar el codón codificante de la metionina 51 del gen M, en el mismo fondo genético que el resto de mutantes.

**Tabla 5.** Selección de mutantes para la realización del cribado.

Nombre	Gen	Posición	Nt <sup>(a)</sup>	Aa <sup>(a)</sup>	Célula evolución	Fuente <sup>(c)</sup>
1978	P	1978	U1978C	S195P	BHK-21	(1)
2151	P	2151	C2151U	Y252I	Hela/MDCK	(2)
2401	M	2401	U2401C	M51T	Hela	(2)
MΔ51	M	2409-2412		M51Ø		(3)
2431	M	2431	A2431G	Y61C	Hela	(2)
2607	M	2607	G2607A	P120A	BHK-21	(4)
2608	M	2608	C2608A	P120G	BHK-21	(1)
2686	M	2686	G2686A	G146E	Hela	(2)
2736	M	2736	A2736G	D257N	Hela/MDCK	(2)
2743	M	2743	G2743A	G165D	BHK-21	(1)
2936	G	2936	A2936C	K229N	BHK-21	(4)
3351	G	3351	G3351A	E92K	BHK-21	(1)
3460	G	3460	A3460C	G128P	MEFs_P53KO	(5)
3846	G	3846	G3846A	D257N	BHK-21	(1)
8679	L	8679	A8679C	D1316A	MEFs_PKR_KO	
11090		11090	A11090G		MEFs_PKR_KO	

<sup>(a)</sup>Nt: nucleotido; <sup>(b)</sup>Aa: aminoácido; <sup>(c)</sup> (1) Cuevas *et al.* 2002, (2) Remold *et al.* 2008, (3) Stojdl *et al.* 2003, (4) Novella *et al.* 1999, (5) Garijo *et al.* (2014). Las mutaciones 11090 y 8679 fueron encontradas en nuestro laboratorio tras evolucionar VSV en células MEFs deficientes en el gen PKR (datos no publicados), la mutación 11090 es de una mutación intergénica.



## 1.2 Análisis fenotípico del panel de mutantes

Cómo se ha citado anteriormente la principal característica de un virus oncolítico es su deficiente o escasa capacidad de replicación en células normales manteniendo su capacidad replicativa en células tumorales. Para detectar esta característica, se puso a punto un ensayo de caracterización fenotípica que nos permitiera seleccionar mutantes deletéreos en células normales, con una replicación normal o beneficiosa en células tumorales basándonos en el tamaño de la calva. Para ello, se plaquean los diferentes virus en las células a testar, se efectúan mediciones del tamaño de la calva y se comparan con un virus control bien caracterizado. El criterio seguido para el análisis de los datos es el siguiente: en células no-tumorales el virus control será el virus *wt* y en células tumorales el virus control será el virus MΔ51. Aquellos virus que formen calvas más pequeñas que el virus *control* se considerarán deletéreos para ese tipo celular por presentar una eficiencia baja, mientras que los virus que formen calvas de mayor/igual tamaño se considerarán virus beneficiosos en ese tipo celular. Con este criterio pretendemos seleccionar virus con menor eficacia que el virus *wt* en células sanas, que sin embargo, presenten una eficacia similar o mayor nuestro virus oncolítico de referencia en células tumorales.

Inicialmente se plaquearon los 15 mutantes en células no tumorales (humanas y de ratón) junto con los correspondientes controles y se

realizaron 15-20 medidas del área de las calvas para cada virus ( $\text{mm}^2$ ). El análisis del tamaño de las calvas indicó que la mayoría de mutantes, 10 de los 15 ensayados, eran deletéreos para estas células, es decir, presentaban un tamaño de calva significativamente menor, en ambas líneas celulares que el virus wt (test de Mann Whitney;  $*p < 0.05$  y  $**p < 0.01$ ) (Tabla S1; Figura 8). Estos resultados presentan coherencia con lo que esperábamos y podría haber dos causas implicadas. Por un lado, las mutaciones proceden de virus adaptados a células tumorales y probablemente esa adaptación tendría un coste en términos de eficacia en cualquier otro tipo celular con características diferentes, en este caso en células sanas. (Agudelo-Romero *et al.* 2008; Cuevas *et al.* 2009; Greene *et al.* 2005; Turner *et al.* 2000). Pero también podría estar dándose un fenómeno de epistasia, lo que haría que al incluirlas de manera singular en el genoma pasaran de ser beneficiosas a ser deletéreas.

Posteriormente, se repitió el mismo ensayo en células tumorales humanas (MCF7, A549) y de ratón (4T1), de manera que pudiéramos seleccionar aquellos mutantes deletéreos en células no-tumorales, que presentaran un tamaño de calva mayor que el virus MΔ51 en células tumorales, buscando así posibles candidatos más potentes que el virus oncolítico de referencia. Las infecciones se realizaron también en células de ratón CT-26. Para llevar en paralelo dos modelos celulares

humanos de cada tipo pero no obtuvimos calvas, por lo que solo usamos células 4T1 como células de ratón.

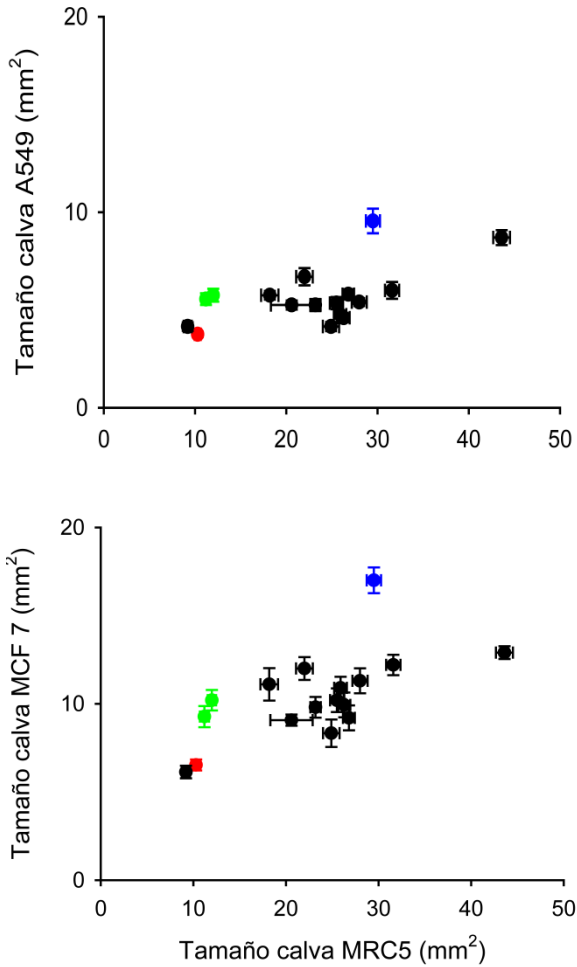
Tras el análisis se observan dos mutantes muy deletéreos en células normales, concretamente los mutantes 2607 y 2608 (test de Mann Whitney;  $p < 0.003$ ). En células MRC5 el virus *wt* tenía un tamaño de calva de  $29.53 \pm 0.77$ , mientras que los mutantes 2607 y 2608, tenían tamaños  $11.20 \pm 0.49$  y  $12.07 \pm 0.45$  respectivamente. En células MEFs el tamaño de calva para el *wt* era  $16.30 \pm 0.54$  y para los mutantes 2607 y 2608 era de  $10.15 \pm 0.44$ ,  $10.10 \pm 0.49$  respectivamente (Tabla S1). Sin embargo, esos dos mutantes presentaban un tamaño de calva significativamente mayor que el virus de referencia MΔ51 en todas las líneas tumorales testadas: MCF7, A549 y 4T1 (test de Mann Whitney;  $p < 0.0001$ ) (Tabla S2; Figura 8).

Para determinar una posible correlación entre el tamaño de calva de los mutantes en células normales y células tumorales se representaron los tamaños de calvas de células MCF7 y A549 frente a células MRC5 (Figura 6). El análisis muestra una correlación positiva significativa en ambos tipos celulares, MCF7 (Correlación Pearson,  $r = 0.642$ ;  $p = 0.005$ ), A549 (Correlación Pearson,  $r = 0.558$ ;  $p = 0.013$ ). Y lo mismo ocurre en células 4T1 y MEF (Correlación Pearson,  $r = 0.782$ ;  $p = 0.001$ ) (Figura 7). Esta correlación en un principio sugiere que no hay una capacidad oncolítica clara, dado que los virus deletéreos en células sanas parecen ser los más deletéreos también en células tumorales, cosa que también se observa en el virus oncolítico de referencia D51. Estos datos indican

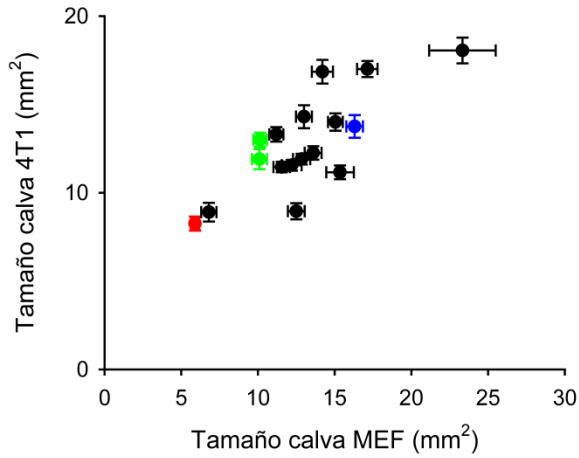
que el virus D51 es un virus en general deletéreo, algo que ocurre con frecuencia en la mayoría de virus oncolíticos. En el intento de disminuir la toxicidad del virus en células sanas se pone en riesgo la potencia del virus frente a células tumorales, obteniendo por lo general virus seguros pero poco eficaces.

Por otro lado, los resultados muestran una dispersión de la varianza del tamaño de las calvas mayor en células normales que en células tumorales. Este fenómeno podría explicarse por la presión selectiva que ejerce el IFN sobre el virus en células sanas, cosa que no ocurre en células tumorales, dado que, replican en ambientes más relajados.

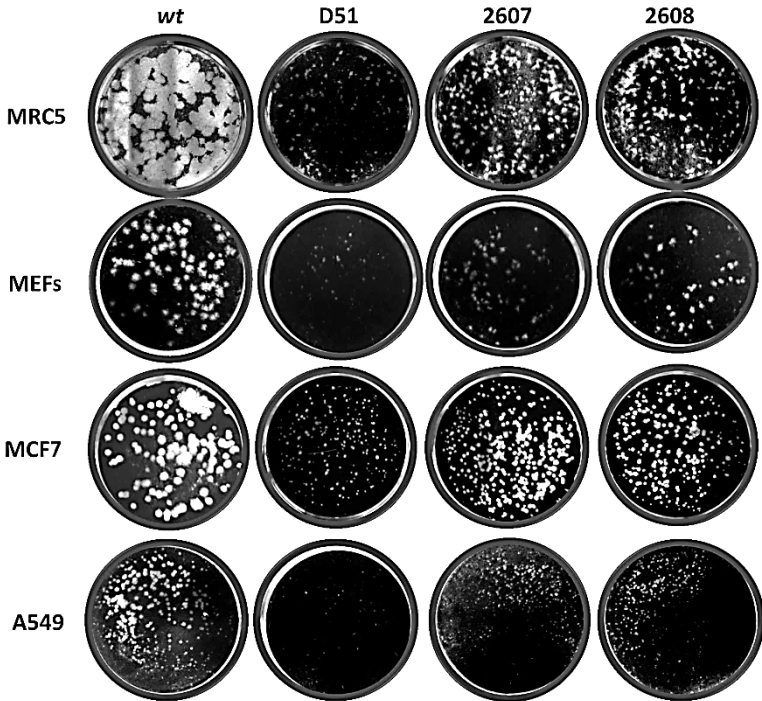
Un dato a destacar, es que en las figuras 6 y 7 se observa cómo uno de los mutantes se mantiene prácticamente en la misma posición que el virus D51. Este mutante es el 2401, posición que dista tan solo ocho nucleótidos de la delección D51 y que por lo tanto explica comportamientos casi idénticos. Nuestro objetivo es obtener un virus más potente que virus de oncolítico de referencia, por lo que este mutante quedó descartado en los posteriores ensayos realizados.



**Figura 6. Tamaño de calva células tumorales vs. no tumorales (Células humanas).** Para cada virus se presenta la media del área, las barras de error indican el SEM. En Azul el virus wt, en rojo D51 en verde los mutantes 2607 y 2608, en negro el resto de mutantes.



**Figura 7. Tamaño de calva células tumorales vs. no tumorales (Células de ratón).** Para cada virus se presenta la media del área, las barras de error indican el SEM. En Azul el virus wt, en rojo D51 en verde los mutantes 2607 y 2608, en negro el resto de mutantes.



**Figura 8. Plaqueos en diferentes tipos celulares.** Se observa una reducción del tamaño de la calva para los mutantes 2607 y 2608, así como para  $\Delta 51$  en células no tumorales (MRC5, MEFs) comparado con el virus *wt*, mientras que en células tumorales (MCF7, A549) el tamaño de calva es mayor para los mutantes que para el virus  $\Delta 51$ .

Los mutantes 2607 y 2608 curiosamente constituyen la posición 1 y 2 de un mismo codón, concretamente, la prolina 120 de la proteína M. Decidimos por tanto, tratar los dos mutantes como uno único. Para ello, por mutagénesis dirigida se llevaron a cabo dos estrategias: por un

lado la delección completa del codón 120; por otro, la sustitución de la prolina por una arginina, pasando de un aminoácido pequeño y rígido a uno grande e inestable. Los nuevos mutantes serán PΔ120 y P120R.

En los ensayos que se desarrollan a continuación estará presente además de los virus PΔ120, P120R y los controles *wt* y MΔ51, otro virus de referencia con características oncolíticas que presenta dos cambios en la proteína M, concretamente V221F/S226R (Brun *et al.* 2010; ), en el mismo fondo genético que el resto de virus, ese virus se llamará U2617/A3802G (Sanjuán *et al.* 2004; Furió *et al.* 2012).

### **1.3 Análisis fenotípico de los mutantes PΔ120 y P120R**

Se plaquearon los cinco virus en células no tumorales (Tabla 6) y en células tumorales (Tabla 7). En las células MRC5 el tamaño de las calvas para los virus PΔ120, P120R, MΔ51 y U2617/A3802G es significativamente menor que para el *wt* y lo mismo ocurre en células MEF (test de Mann Whitney;  $p < 0.001$ ) (Tabla 6), indicando que los nuevos mutantes mantienen un fenotipo atenuado en células no tumorales.

Los resultados de los plaqueos en células tumorales señalan que el mutante P120R presenta un tamaño de calva significativamente mayor que el virus de referencia MΔ51 en los tres tipos celulares testados (test de Mann Whitney;  $p < 0.0001$ ). Para el mutante PΔ120 los resultados



muestran un tamaño de calva significativamente mayor en células A549 (test de Mann Whitney:  $p < 0.0001$ ) y un tamaño de calva similar a los virus MΔ51 y U2617G/A3802G en células MCF7 y 4T1.

**Tabla 6.** Tamaño de las calvas en células no-tumorales.

VIRUS	Tamaño calva (mm <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	
	MRC5	MEFs
WT	34.03±0.85	22.10 ± 0.55
MΔ51	6.53±0.22**	8.52 ± 0.20**
P120R	10.08±0.17**	12.17 ± 0.45**
PΔ120	10.89±0.10**	11.48 ± 0.22**
U2617G/A3802G	10.17±0.17**	10.67 ± 0.13**

\*Test de Mann Whitney (corrección Dunn-sidak), comparaciones con el virus wt (\*\* $p < 0.003$ , \* $p < 0.01$ )

**Tabla 7.** Tamaño de las calvas en células tumorales.

VIRUS	Tamaño calva (mm <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>		
	MCF7	A549	4T1
WT	11.88 ± 0.19**	17.48 ± 0.09**	15.05 ± 0.38**
MΔ51	8.37 ± 0.36	8.80 ± 0.39	7.07 ± 0.37
P120R	10.60 ± 0.42**	11.23 ± 0.25**	10.32 ± 0.45**
PΔ120	8.10 ± 0.57	11.67 ± 0.21**	9.59 ± 0.03
U2617G/ A3802G	8.12 ± 0.09	NC	9.68 ± 0.19

\*Test de Mann Whitney (corrección Dunn-sidak), comparaciones con el virus MΔ51 (\*\*p <0.003, \*p<0.01)

En conclusión, el análisis fenotípico muestra un comportamiento atenuado de los virus con cambios en la prolina 120 de la proteína M en células no tumorales con respecto al virus *wt*. En células tumorales el virus P120R ha mostrado un comportamiento beneficioso comparado con los dos virus oncolíticos de referencia y el virus PΔ120 parece tener un comportamiento similar a los virus de referencia.

Una vez realizado el cribado inicial, que es una metodología sencilla y con un coste reducido, vamos a profundizar en el comportamiento de estos dos nuevos mutantes. Por un lado evaluaremos la eficacia de

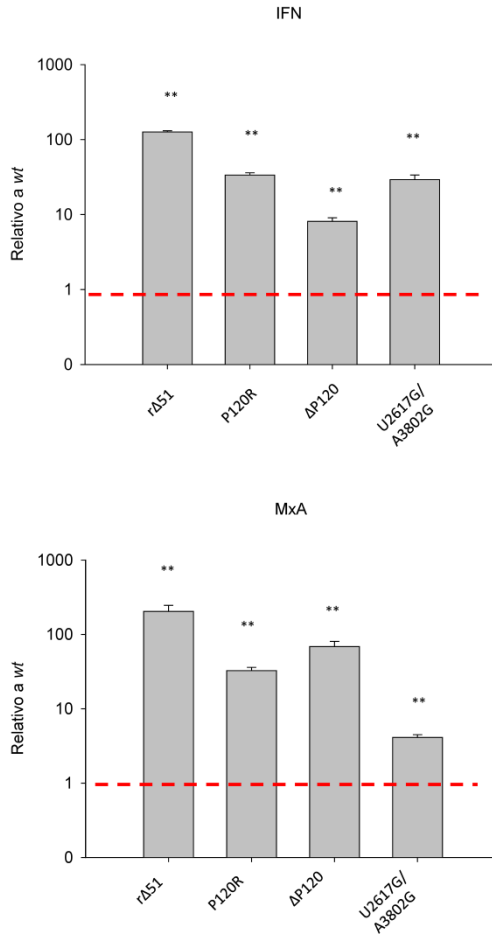
estos virus comparada con los virus de referencia y por otro mediremos su toxicidad. Dado el elevado coste de algunos de los ensayos que se van a realizar para esta nueva batería de ensayos nos centraremos únicamente en células humanas.

#### **1.4 Cuantificación de la síntesis de IFN $\beta$**

La proteína M de VSV tiene entre otras funciones la de bloquear el transporte de RNA mensajeros entre el núcleo y el citoplasma (Reis *et al.* 2009; Rose *et al.* 2001), bloqueándose por tanto la síntesis de proteínas del hospedador, entre ellas el IFN. Para determinar si los cambios en la prolina 120 provocan algún tipo de alteración en la secreción de IFN se cuantificó la expresión de ARN mensajero citoplasmático de IFN- $\beta$  y MxA (gen inducible por IFN) en células humanas MRC5 competentes para la síntesis de IFN (Figura 9). Para ello, se infectaron células MRC5 a MOI 3, 8 horas post-infección se realizó la extracción del ARN celular y por PCR cuantitativa se midieron los niveles de ARN mensajero para los dos genes, normalizando los valores con el gen de expresión constitutiva GAPDH. Los niveles de expresión de ambos genes se presentan relativos al virus wt.

En los cuatro virus se observa un aumento significativo para la expresión de IFN y MxA con respecto al wt, (test-t para muestras relacionadas  $p < 0.01$ ), sin embargo, los virus P $\Delta$ 120, P120R producen

15.6 y 3.8 veces menos IFN respectivamente que el virus de referencia MΔ51. Lo mismo ocurre para el gen MxA: los mutantes PΔ120, P120R producen 3 y 6.3 veces menos MxA respectivamente que el MΔ51 (Figura 9). Estos resultados indican que cambios en la prolina 120 de la proteína M afectan a la capacidad para inhibir IFN, reduciéndose significativamente cuando se comparan con el virus *wt* (test-t para muestras relacionadas  $p < 0.01$ ), aunque en menor grado que la que puede observarse para la delección de la metionina 51 de la misma proteína, en el virus MΔ51. Resultados que están en concordancia con la menor atenuación sufrida por los mutantes 2607 y 2608 en comparación con MΔ51 en células MRC5, a juzgar por los tamaños de calva en este tipo celular.



**Figura 9.** Cuantificación de los ARNs mensajeros de los genes IFN y MxA en células MRC5 por PCR cuantitativa. Los valores se representan relativos al virus wt. Para cada muestra se evaluaron los cambios en la secreción de IFN mediante un test-t para muestras relacionadas (\*\*:  $p < 0.01$ ). Las barras de error indican el SEM.

## 1.5 Determinación de la eficacia de los mutantes

Otro aspecto importante en la caracterización de los nuevos mutantes es la eficacia que presentan en los diferentes tipos celulares. Esto nos ayudará a confirmar si el fenotipo de calva que observamos se reproduce en términos de eficacia, informándonos más acerca de la posible utilidad oncolítica del virus.

Se determinó la eficacia de los mutantes PΔ120 y P120R para un ciclo de infección y para varios ciclos. Para ello, se realizaron infecciones a 24h a alta MOI (MOI 10) y baja MOI (MOI 0.1), se recogieron los sobrenadantes y se determinó el título para cada virus. Como controles se incluyeron los virus MΔ51, U2617/A3802G y *wt*.

Con una infección a MOI 10, aseguramos la infección del 100% de las células que hay en el cultivo, permitiéndose un solo ciclo de infección. Los resultados a alta MOI nos proporcionarán pues la productividad del virus en un ciclo. Por el contrario, a MOI 0.1 sólo el 10% de las células serán infectadas en el primer ciclo, de manera que en 24 h se darán dos ciclos de infección. Las infecciones a baja MOI nos proporcionarán información acerca de la capacidad del virus para propagarse en el cultivo. Si el virus presenta propiedades oncolíticas, en células no tumorales donde se activen los mecanismos de defensa antivirales la propagación del virus se verá disminuida tras varios ciclos de infección. Sin embargo, no deberíamos de observar grandes diferencias respecto

al wt en células tumorales, donde los mecanismos de defensa antivirales se encuentran inactivos.

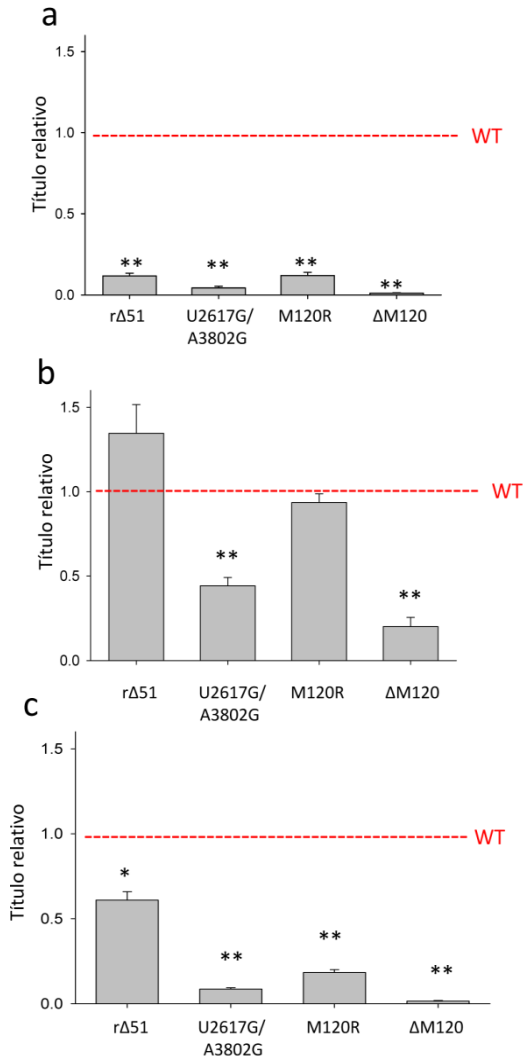
Los resultados obtenidos a alta MOI en células MRC5 indican que todos los virus son deletéreos con respecto al virus wt (test-t;  $p < 0.01$ ). Lo mismo ocurre en las células A549, resultando ser el virus MΔ51 algo más eficiente (test-t;  $p < 0.05$ ) que el resto de virus (test-t;  $p < 0.01$ ). En células MCF7, los virus MΔ51 y P120R no presentan diferencias significativas respecto al wt (test-t;  $p = 0.113$  y  $p = 0.339$  respectivamente) mientras que los virus U2617/A3802G y PΔ120 son significativamente deletéreos con respecto al virus wt (test-t;  $p < 0.01$ ) (Figura 10).

Cuando se dan varios ciclos de infección, a baja MOI, se observa un resultado similar al anterior, una baja eficiencia de todos los virus con respecto al virus wt en células MRC5 (test-t;  $p < 0.01$ ) y en A549 (test-t;  $p < 0.01$ ). En células MCF7 el virus P120R presenta una eficacia similar al wt (test-t;  $p = 0.248$ ), mientras que el resto de virus presentan eficiencias significativamente más bajas MΔ51 y U2617/A3802G (test-t;  $p < 0.05$ ), PΔ120 (test-t;  $p < 0.01$ ) (Figura 11).

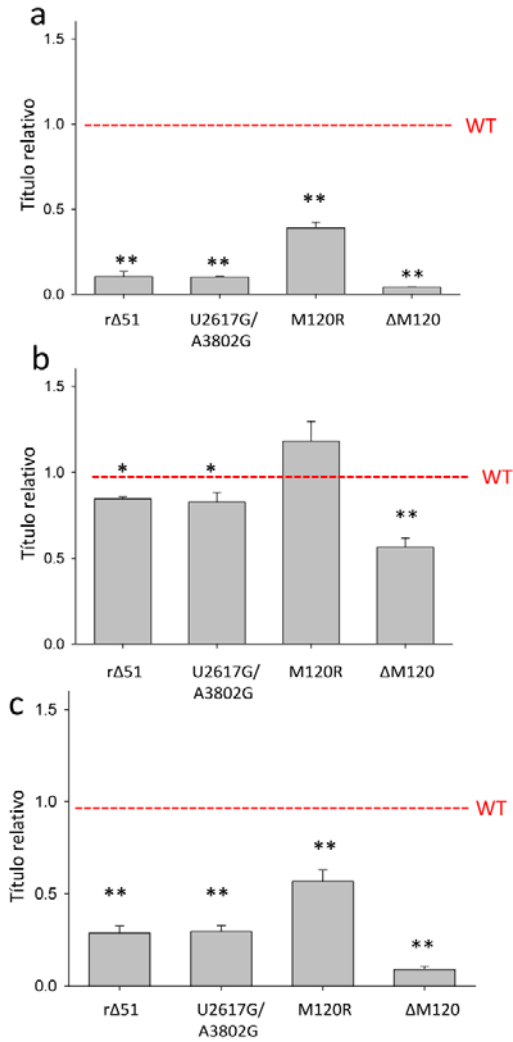
En conclusión, podemos afirmar que el virus PΔ120 presenta una eficacia baja de manera generalizada, resultando un virus deletéreo en todos los tipos celulares ensayados. Por el contrario, el mutante P120R parece tener un comportamiento similar al virus oncolítico de referencia MΔ51, resultando deletéreo en células no tumorales y

beneficioso en células tumorales y presentando incluso mayor eficiencia que el virus MΔ51 en células MCF7.





**Figura 10.** Título relativo 24 horas post infección a MOI 10 en Células a) MRC5, b) MCF7 y c) A549.



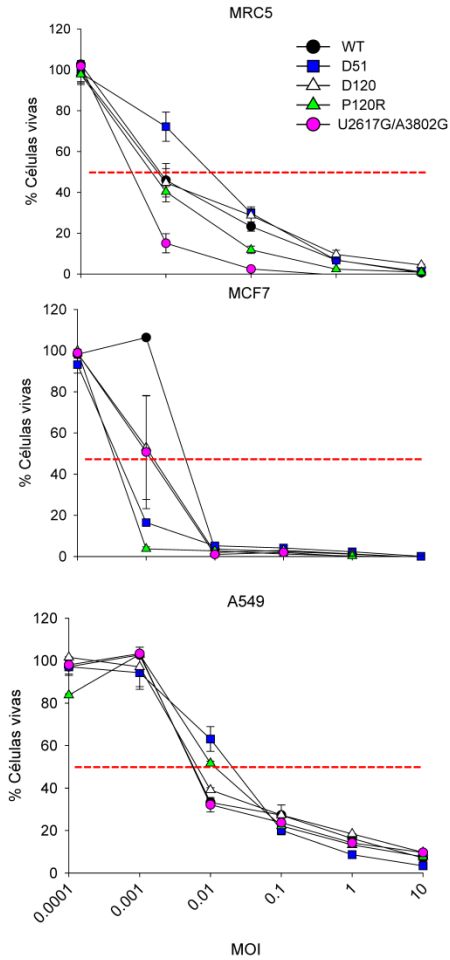
**Figura 11.** Título relativo 24 horas post infección a MOI 0.1 en Células a) MRC5, b) MCF7 y c) A549.

## 1.6 Determinación de la EC50

Se realizaron ensayos para la determinación de la dosis media efectiva ( $EC_{50}$ ) en células tumorales y no tumorales, lo que nos proporcionaría la toxicidad de estos nuevos mutantes. Para ello, se realizaron infecciones a diferentes MOI con los virus P $\Delta$ 120 y P120R, en células MRC5, MCF7 y A549. Posteriormente a las 48 h se determinó la viabilidad celular a con el reactivo Alamar blue. Como controles se usaron los virus M $\Delta$ 51, U2617/A3802G y wt.

En células MRC5 los mutantes P $\Delta$ 120 y P120R presentan  $EC_{50}$  similares igual al virus wt, P $\Delta$ 120 (0.0091), P120R (0.0063) y wt (0.0087), mientras que para el virus oncolítico M $\Delta$ 51 la  $EC_{50}$ (0.02) es aproximadamente 2.5 veces mayor (Tabla 8; Figura 12). En células tumorales el virus P $\Delta$ 120 presenta en todas las líneas celulares una citotoxicidad similar al wt, mientras que el virus P120R resultó ser 10 hasta veces más citotóxico que el virus wt en células A549 y MCF7 (Tabla 8; Figura 12).

Estos datos indican que mientras que para el virus de referencia M $\Delta$ 51 se confirma una ventana terapéutica, pues resulta menos tóxico en células normales que en células tumorales, en el caso de células MCF7, aunque no para A549, no podemos afirmar lo mismo para los mutantes P $\Delta$ 120 y P120R. Según estos datos, los mutantes P $\Delta$ 120 y P120R presentan toxicidades similares en los tipos celulares evaluados, lo que se traduce en una falta de especificidad de ambos virus.



**Figura 12.** Dosis media efectiva (EC50). Células MRC5, MCF7 y A549 fueron infectadas con MOI decrecientes de los virus indicados durante 48h, posteriormente, se midió la viabilidad celular determinándose la EC50 para cada virus.

**Tabla 8.** Dosis media efectiva (EC<sub>50</sub>).

Células	Virus	EC <sub>50</sub> (PFU/célula)	IC95% EC <sub>50</sub>
MRC5	wt	$8.7 \times 10^{-3}$	$(7.6-0.9) \times 10^{-3}$
	Δ51	$2.1 \times 10^{-2}$	$(2.0-2.2) \times 10^{-2}$
	Δ120	$9.1 \times 10^{-3}$	$(7.0-1.2) \times 10^{-3}$
	P120R	$6.3 \times 10^{-3}$	$(6.2-6.3) \times 10^{-3}$
	U2617G/A3802G	$6.0 \times 10^{-4}$	$(5.8-6.2) \times 10^{-4}$
A549	wt	$8.2 \times 10^{-3}$	$(8.0-8.4) \times 10^{-3}$
	Δ51	$1.7 \times 10^{-2}$	$(1.6-1.7) \times 10^{-2}$
	Δ120	$5.7 \times 10^{-3}$	$(4.9-6.5) \times 10^{-3}$
	P120R	$1.0 \times 10^{-2}$	$(9.1-0.9) \times 10^{-3}$
	U2617G/A3802G	$8.4 \times 10^{-3}$	$(8.1-8.7) \times 10^{-3}$
MCF7	wt	$5.9 \times 10^{-3}$	$(5.9-5.9) \times 10^{-3}$
	Δ51	$2.2 \times 10^{-4}$	$(2.2-2.3) \times 10^{-4}$
	Δ120	$1.0 \times 10^{-3}$	$(1.0-1.1) \times 10^{-3}$
	P120R	$1.7 \times 10^{-4}$	$(1.7-1.7) \times 10^{-4}$
	U2617G/A3802G	$1.0 \times 10^{-3}$	$(1.0-1.1) \times 10^{-3}$

Tras el análisis en profundidad de los mutantes PΔ120 y P120R podemos resumir que a pesar de ser mutantes con un fenotipo atenuado en células normales resultan extremadamente tóxicos en estas células, algo que en principio parece incoherente. Sin embargo, como se ha demostrado en algunos trabajos, toxicidad y eficacia no siempre se correlacionan (Furió *et al.* 2012). En el cribado inicial este fenómeno podría quedar enmascarado, puesto que el tamaño de calva nos va a mostrar la eficacia del virus para propagarse y formar las calvas, pero no la toxicidad. La calva quizás es una medida indirecta de

toxicidad y propagación viral, dado que, las células han de morir para formar la calva y ésta aumentará en tamaño o no dependiendo de la capacidad del virus para propagarse. Podría ser que el área sea grande pero no estén todas las células muertas y viceversa.

En conclusión, según los resultados obtenidos tras la caracterización de los mutantes, no encontramos evidencias suficientes para afirmar que los mutantes PΔ120 y P120R sean virus específicos con un perfil oncolítico, por lo tanto y desafortunadamente, quedan descartados como virus con potencial oncolítico. Otra puntualización a resaltar, es que el virus U2617/A3802G, para el cual se han demostrado propiedades oncolíticas cuando esas mutaciones se encuentran en el virus Maraba, también de la familia *Rabdoviridae* (Brun *et al.* 2010), no parece conservar las mismas propiedades cuando se extrapolan al genoma de VSV, mostrando una toxicidad incluso mayor que el virus *wt* en células sanas, MRC5).

## **2. Desarrollo de un virus oncolítico mediante evolución experimental**



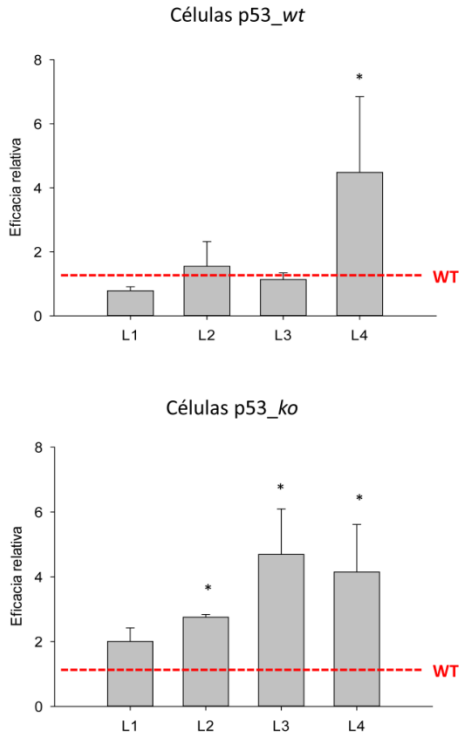


## 2.1 Pases seriados y eficacia biológica de los virus evolucionados

El objetivo de este trabajo es el desarrollo de un virus con capacidad oncolítica usando como herramienta la evolución experimental. Con ese fin se efectuaron pases seriados de VSV en células deficientes en p53 (p53 *ko*). Las infecciones se realizaron a MOI 0.1y a las 24 hpi se recogían los sobrenadantes y se efectuaba el siguiente pase. Para cada virus se realizaron 4 réplicas con la finalidad de detectar posibles paralelismos en la evolución. Después de 40 pases procedimos a determinar la eficacia biológica ( $W$ ) de los virus evolucionados frente al virus ancestral.

Para determinar  $W$  se realizaron ensayos de competencia en células p53 *ko* y en células p53 *wt*. Se realizó una co-infección de cada virus evolucionado con el ancestro, midiéndose el ratio de títulos ( $r$ ) del evolucionado ( $e$ )/ancestro ( $a_n$ ) a tiempo 0 y a las 24h. La eficacia relativa se calculó como  $W = r_e/r_{a_n}$ . Como puede observarse en la Figura 13, de los cuatro linajes evolucionados tres de ellos (L2-L4) muestran un incremento significativo de la eficacia respecto al virus ancestral en las células donde han sido evolucionados (p53 *ko*) (test-t;  $p < 0.05$ ), mientras que sólo uno de ellos (L4) muestra diferencias de eficacia significativas en células *wt* (test-t;  $p < 0.05$ ). Estos resultados indican que los linajes L2 y L3 han incrementado su eficacia específicamente en

células p53 *ko*, L4 podría haber sufrido adaptación al tipo celular (células MEF), mientras que L1 no muestra signos de adaptación.



**Figura 13.** Eficacia relativa de los linajes evolucionados en las células de evolución (p53 *ko*) y en células *wt*, la eficacia del ancestro (*wt*) está representada por la línea discontinúa roja. Para cada muestra se evaluaron los cambios en la eficacia mediante un test-t (\*:  $p < 0.05$ ). Las barras de error indican el SEM.

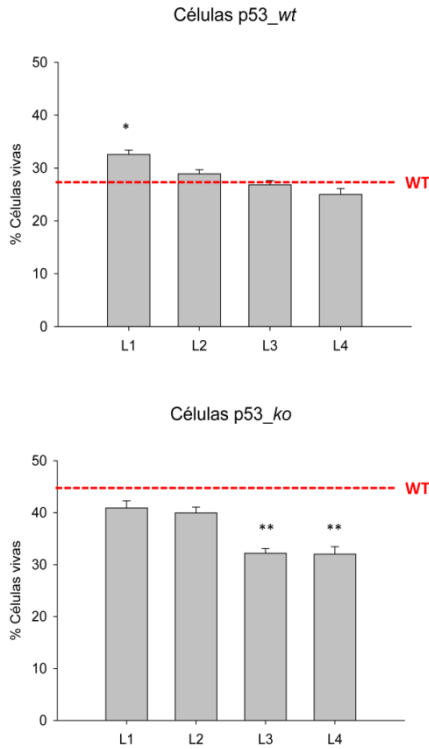
## 2.2 Efecto citotóxico

Ha sido demostrado en trabajos previos que normalmente existe una correlación entre eficacia biológica y la citotoxicidad (Furió *et al.* 2012; Pagán *et al.* 2007). Para confirmar si en este caso se daba dicha correlación se hicieron ensayos de citotoxicidad mediante el reactivo MTS para el ancestro y los cuatro linajes, en células p53 *ko* y en células *wt*. Se usó una MOI 3) en la que nos aseguramos de que aproximadamente el 95% de las células están infectadas, permitiendo un solo ciclo de infección, para así poder asociar el efecto de la toxicidad a la virulencia del virus de manera independiente a su velocidad de propagación en el cultivo.

Los resultados se representan relativos al ancestro (Figura 14). En células p53 *ko* dos de los linajes (L3-L4) presentan mayor virulencia que el ancestro (test-t;  $P < 0.01$ ). Para comprobar si el aumento de la virulencia estaba ligado a una adaptación al defecto del gen p53, en paralelo se llevó a cabo el mismo ensayo en células isogénicas *wt*, donde encontramos que los linajes L2, L3 y L4 no presentan evidencias significativas de un incremento en la virulencia con respecto al ancestro (test-t:  $p > 1$ ). Sin embargo, L1 sí presenta un incremento de la virulencia estadísticamente significativo en células *wt* (test-t;  $p < 0.05$ ).

Los resultados obtenidos muestran que de los cuatro linajes evolucionados, L3 es el que presenta mayor eficacia biológica y citotoxicidad en células p53 *ko*, manteniendo propiedades similares al

ancestro en células *wt*. Esto es indicador de una adaptación específica de L3 a la deficiencia del gen p53, sin embargo, L4 muestra signos claros de una adaptación a la línea celular MEF o a sus condiciones de cultivo, mostrando mayor eficacia biológica y mayor virulencia en ambas líneas celulares. Por otro lado L1 no muestra cambios significativos en cuanto a eficacia y sí parece haber aumentado su virulencia modestamente en las células *wt* y L2 muestra un aumento significativo de la eficacia pero no de la virulencia.



**Figura 14.** Efecto citotóxico de los linajes evolucionados en las células de evolución (p53 *ko*) y en células *wt*, la citotoxicidad del ancestro (WT) está representada por la línea discontinúa roja. Para cada muestra se evaluaron los cambios en la eficacia mediante un test-t (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ). Las barras de error indican el SEM.

## 2.3 Bases moleculares de la adaptación

Se evolucionaron cuatro linajes independientes con el objetivo de detectar posibles mutaciones paralelas. Tras la evolución, se secuenciaron los genomas prácticamente completos (95% del genoma, las bases 60-11.100) del pase 40 de los cuatro linajes. Los resultados muestran 13 sustituciones (fijadas) y un polimorfismo. Nueve constituían un cambio aminoacídico y las otras cinco eran sinónimas. Sin embargo, no se detectaron convergencias, únicamente el polimorfismo (C10224Y) en los linajes L2 y L4, pero tratándose de un polimorfismo, y no de una mutación fijada, no podría considerarse como tal (Figura 15). Además, ese cambio aparece en los linajes 2 y 4 donde no se detecta adaptación específica a las células p53 *ko*. En general, la localización de los cambios detectados se encuentra dentro de lo esperado, dado que, P y G son los genes que mayor variabilidad natural presentan (Letchworth *et al.* 1999; Rainwater-Lovett *et al.* 2007).

Gen	P					G				L				
Sustitución (nt)	G1414A	U1438C	G1456U	G1459A	U1629C	A3460C	C3716U	U3894A	U4492C	G5129A	U5542C	U5998G	A8653G	C10224U
Sustitución (aa)		S15P	V21L	G22R		G128P		S273T	I472T	G133S		F422L		T1831M
L1														
L2														
L3														
L4														

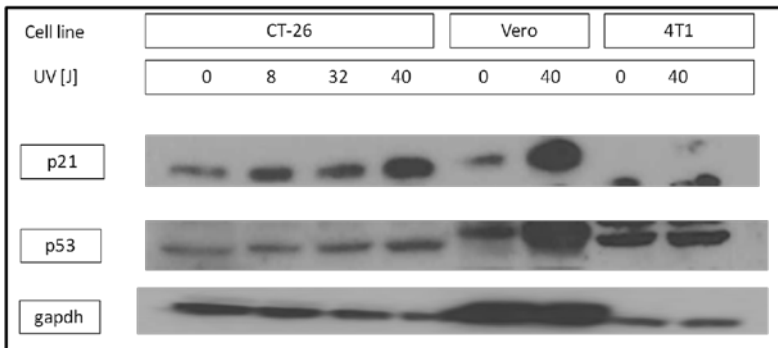
**Figura 15. Sustituciones nucleotídicas de los linajes evolucionados.** Para cada mutación se muestra el cambio nucleotídico (nt) así como el cambio de aminoácido (aa). En azul las sustituciones sinónimas y en rojo las no-sinónimas, el interlineado corresponde a un polimorfismo.

Tras comprobar que a nivel molecular no parece haber cambios relevantes debidos al proceso de selección durante la evolución, decidimos continuar nuestro trabajo con los linajes completos en lugar de desarrollar mutantes simples, concretamente con L2 y L3, pues ambos linajes presentan mayor eficacia que el virus ancestral, aunque sólo L3 ha aumentado su toxicidad en esas células.

## 2.4 Capacidad oncolítica y eficacia in vivo

### 2.4.1 Dosis media efectiva ( $EC_{50}$ )

Para demostrar si existía especificidad hacia cualquier tipo celular con alteraciones en la funcionalidad de gen p53 se eligieron dos líneas celulares de ratón procedentes de la cepa Balb/c, CT-26 y 4T1, funcionales y no funcionales para p53, respectivamente (Figura 16), donde se midió la dosis media efectiva ( $EC_{50}$ ) para L2, L3 y WT. La funcionalidad de la proteína p53 se determinó evaluando la expresión de su gen diana p21 como se muestra en la Figura 16.



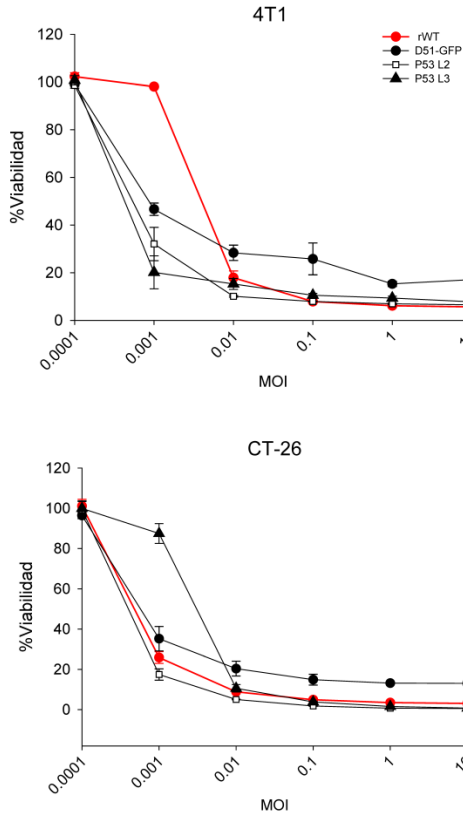
**Figura 16. Funcionalidad de la proteína p53.** Las células fueron irradiadas con UV a  $4J/m^2$  para inducir daño al ADN durante 0,2, 5 y 10 segundos y medimos la expresión de las proteínas p53 y p21 (gen diana de p53). Se observa la inducción de p53 así como de su gen diana en células CT-26 y Vero, pero no en células 4T1.



Ambos tipos celulares fueron infectados con valores de MOI crecientes de los tres virus, determinándose la viabilidad celular usando Alamar Blue a 48 hpi. En estos ensayos incluimos como control el virus oncolítico de referencia VSV-MΔ51-GFP (Stojdl *et al.* 2003). Se estimó la EC<sub>50</sub> para cada virus por regresión no lineal, observándose que L2 presenta mayor efectividad que el WT para ambos tipos celulares (Figura 17), mientras que L3 presenta mayor efectividad que el virus WT en 4T1 pero no en CT26. En células 4T1 el control VSV-MΔ51-GFP es más efectivo que el virus WT, no ocurriendo lo mismo en las células CT-26 (Tabla 9).

**Tabla 9.** Dosis media efectiva (EC<sub>50</sub>) en células CT-26 y 4T1 de los virus L2, L3 y los controles WT y MΔ51

Células	Virus	EC <sub>50</sub> (PFU/célula)	IC95% EC <sub>50</sub>
CT-26	L2	$8.7 \times 10^{-05}$	$(8.6-8.7) \times 10^{-05}$
	L3	$1.9 \times 10^{-03}$	$(1.8-1.9) \times 10^{-03}$
	WT	$2.2 \times 10^{-04}$	$(2.2-2.2) \times 10^{-04}$
	MΔ51	$2.4 \times 10^{-04}$	$(2.4-2.4) \times 10^{-04}$
4T1	L2	$4.4 \times 10^{-04}$	$(4.3-4.4) \times 10^{-04}$
	L3	$1.8 \times 10^{-05}$	$(1.7-1.9) \times 10^{-05}$
	WT	$2.8 \times 10^{-03}$	$(2.8-2.8) \times 10^{-03}$
	MΔ51	$7.4 \times 10^{-04}$	$(7.4-6.3) \times 10^{-04}$



**Figura 17.** Dosis media efectiva ( $EC_{50}$ ). Células CT26 y 4T1 fueron infectadas con MOI decrecientes de los virus indicados durante 48h, posteriormente, se midió la viabilidad celular determinándose la  $EC_{50}$  para cada virus.

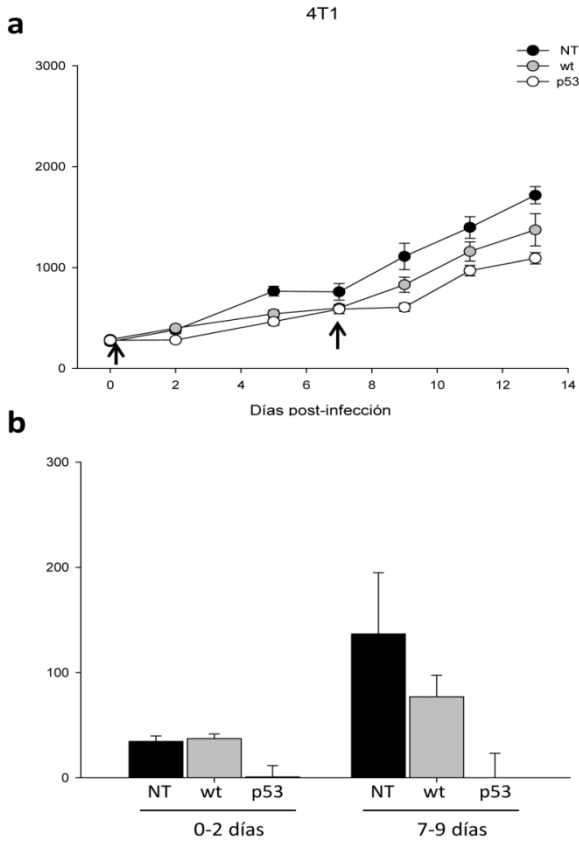
Estos resultados sitúan de nuevo a L3 como el virus más específico de la deficiencia del gen p53, pasando a ser el candidato para realizar la experimentación *in vivo*.

### 2.4.2 Determinación de la eficacia de L3 en ensayos *in vivo*.

Se implantaron tumores subcutáneos singénicos mediante inyección subcutánea en el flanco derecho de células tumorales 4T1 a un grupo de 25 ratones hembra de la cepa Balb/c. Cuando el tumor alcanzó un tamaño de aproximadamente  $200 \text{ mm}^3$  (7 días post-implantación) se inició el tratamiento con  $10^8$  PFU del virus WT, L3 (10 ratones con cada virus) o con PBS (grupo control con 5 ratones), todas las inyecciones fueron intra-tumorales, inoculándose  $50\mu\text{L}$  de la suspensión viral o del tampón. Siete días después se les volvió a administrar la misma dosis.

Se realizó un seguimiento periódico de los ratones para observar posibles síntomas clínicos asociados a la infección por VSV y cada dos días se fueron realizando medidas del tumor con un pie de rey. Dos de los ratones inoculados con el virus L3 murieron en los días 7 y 9 por causas desconocidas, pues en ningún momento presentaron síntomas asociados a una infección por VSV y el tamaño del tumor en ambos casos era menor de  $500 \text{ mm}^3$ , lo que en principio tampoco debería haber sido la causa de la muerte. El experimento terminó el día 13 cuando 8 de los 23 animales habían sido sacrificados (4/5 tratados con PBS, 3/10 tratados con el virus WT y 1/8 tratados con el virus L3). Durante el transcurso del experimento hubo diferencias en cuanto al crecimiento del tumor entre grupos tratados y no tratados cuando se introduce el tiempo como co-variable (ANOVA de un factor,  $p < 0.001$ ), observándose claramente un retraso en el crecimiento del tumor en los

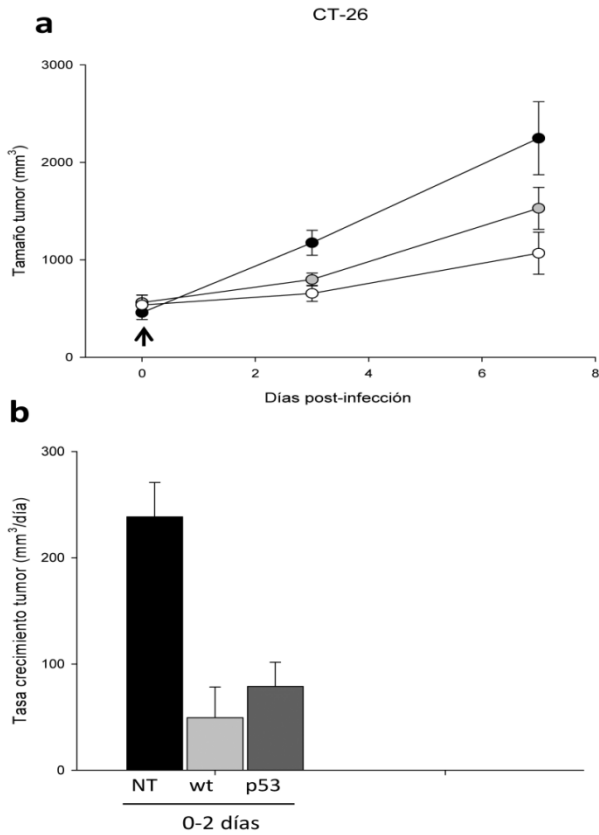
ratones tratados con el virus L3 con respecto a los no tratados ( $p < 0.001$ ), o a los tratados con virus WT ( $p = 0.002$ ) a lo largo del tiempo (Figura 18). La observación más interesante fue el retraso en el crecimiento del tumor durante los dos días posteriores a la inoculación del virus, fenómeno observado en las dos inoculaciones efectuadas. El crecimiento del tumor dos días después de la primera dosis (día 2) fue ( $0.84 \pm 10.74 \text{ mm}^3/\text{día}$ ) para L3, ( $37.30 \pm 4.3 \text{ mm}^3/\text{día}$ ) para el virus WT y ( $34.56 \pm 5.17 \text{ mm}^3/\text{día}$ ) para el grupo control tratado con PBS. Después de la segunda dosis (día 9) el crecimiento del tumor fue de -  $16.30 \pm 23.37 \text{ mm}^3/\text{día}$  para el grupo tratado con el virus L3,  $77.02 \pm 20.51 \text{ mm}^3/\text{día}$  para el los del grupo WT y  $136.67 \pm 58.20 \text{ mm}^3/\text{día}$  para el grupo no tratado. Estos resultados muestran claramente que el virus L3 produce un retraso significativo del tumor a corto plazo con respecto al virus WT y al control no tratado (test-t;  $p < 0.05$ ; día 2) y (test-t;  $p < 0.01$ ; día 9).



**Figura 18.** Efecto de VSV L3 (blanco), WT (gris) o no tratados (NT, negro) en el crecimiento de los tumores 4t1. Las flechas indican las inoculaciones. Las barras de error indican el SEM.

En un intento de determinar la especificidad del virus L3 también *in vivo*, se repitió el experimento con células CT26 (funcionales para p53).

El procedimiento fue idéntico: a un grupo de 24 ratones se les implantaron células CT-26 y cuando el tumor alcanzó aproximadamente  $200\text{mm}^3$  (para estas células 11 días después) fueron divididos en tres grupos, cuatro formaron parte del grupo control con PBS, diez fueron inoculados con WT y los otros diez con el virus L3. Las dosis empleadas fueron las mismas que para el experimento anterior. El experimento terminó el día 7 cuando 9/24 animales habían sido sacrificados. En este caso se observaron diferencias entre los grupos tratados y el grupo control, observándose un retraso en el crecimiento del tumor en los ratones que habían sido tratados, virus WT (ANOVA un factor;  $p=0.004$ ) y L3 ( $p=0.041$ ) respecto al grupo control. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los dos virus WT y L3 ( $p=0.332$ ; Figura 19). Por otro lado la respuesta durante los 2 días posteriores a inoculación en ambos casos fue mayor para los grupos tratados WT ( $49.4\pm 28.9\text{ mm}^3/\text{día}$ ) y L3 ( $78.8\pm 22.9\text{ mm}^3/\text{día}$ ) que para el grupo control ( $238\pm 32\text{ mm}^3/\text{día}$ ), pero tampoco se encontraron diferencias significativas entre ambos virus ( $p=0.436$ ; Figura 19). Estos resultados indican, como esperábamos, que el virus L3 es más efectivo que el WT en tumores que son defectivos en la funcionalidad del gen p53, pero no en tumores con p53 funcional.



**Figura 19.** Efecto de VSV L3 (blanco), WT (gris) o no tratados (NT, negro) en el crecimiento de los tumores CT26. Las flechas indican las inoculaciones. Las barras de error indican el SEM.





### **3. Estabilidad genética de un virus oncolítico**



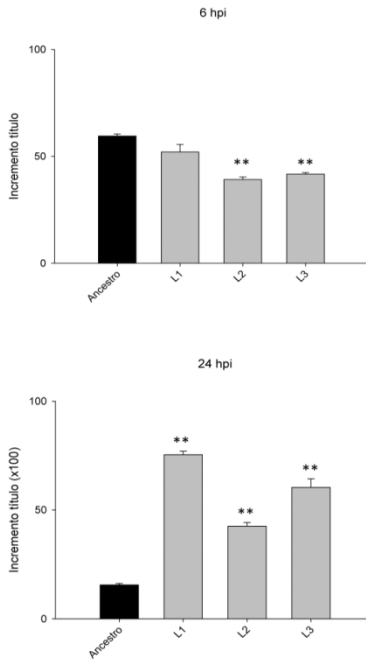
### **3.1 Pases seriados y análisis de los linajes evolucionados**

Para comprobar la estabilidad/variabilidad de un virus oncolítico de referencia como es VSV-M $\Delta$ 51-GFP, realizamos pases de evolución en células no tumorales donde el virus está bajo la presión selectiva ejercida por el IFN. VSV-M $\Delta$ 51-GFP es un virus oncolítico que muestra un comportamiento atenuado en tejidos sanos debido a su incapacidad para bloquear la síntesis de IFN, propiedad que le viene dada por la delección de la metionina 51 de la proteína M (Stojdl *et al.* 2003) y además hemos corroborado en el capítulo 1 de esta tesis. Tras varios pases de evolución en células competentes para la síntesis de IFN se procederá a la evaluación de los virus evolucionados frente al virus ancestral. Las infecciones se realizaron a MOI 0.1 y el tiempo de infección era de 24 h. Se efectuaron 20 pases de evolución en células MRC5, llevándose en paralelo 3 líneas independientes para detectar posibles paralelismos.

#### **3.1.1 Eficacia de los clones evolucionados**

Tras la evolución se determinó el crecimiento de los clones a un tiempo inicial (6h) y a un tiempo tardío de la infección (24h). Para ello se realizaron infecciones con los tres virus evolucionados y el ancestro en células MRC5 a MOI 0.1, se recogieron los sobrenadantes a las 6h y a las 24h y se titularon.

Los resultados muestran que al inicio de la infección L2 y L3 presentan eficacias significativamente menores que el ancestro (test-t;  $p < 0.01$ ) (Figura 20). Por el contrario, a 24 hpi los tres virus evolucionados incrementan su título entre 3 y 5 veces más que el virus ancestral (test-t;  $p < 0.01$ ) (Figura 20). Las células MRC5 producen IFN tras la infección por VSV. Sin embargo, la presencia de IFN no se detecta hasta durante las primeras 10 hpi (resultados no mostrados). El resultado que observamos podría estar relacionado con este hecho, de manera que los virus se habrían adaptado a la presencia de IFN presentando mejor eficacia que el virus ancestral cuando hay IFN en el medio, quizás, por haber recuperado la capacidad de inhibirlo. Sin embargo, es posible que dicha adaptación acarree un coste, y por eso, en ausencia de IFN la eficiencia de replicación de estos virus se vería disminuida respecto al virus ancestral.



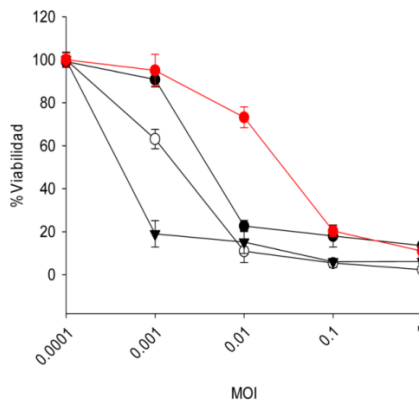
**Figura 20.** Eficacia de los tres linajes y del virus ancestral en células MRC5. Se evaluó el incremento de título a las 6 y a las 24 hpi de los virus evolucionados (L1-L3) frente al ancestro mediante un test-t (\*\*:  $p < 0.01$ ). Las barras de error indican el SEM.

### 3.1.2 Determinación de la citotoxicidad de los linajes evolucionados

Se determinó la virulencia de los 3 linajes y del ancestro mediante un ensayo de viabilidad celular. Para ello, se realizó la infección de un cultivo de células MRC5 con diluciones seriadas de los diferentes virus.

Para cada virus, se realizaron tres réplicas independientes y 48 hpi se procedió cuantificar la viabilidad celular con el reactivo Alamar Blue.

Se calculó la dosis media efectiva ( $EC_{50}$ ) por regresión no lineal para cada virus, observándose una disminución de la  $EC_{50}$  de hasta dos órdenes de magnitud en los virus evolucionados con respecto al virus ancestral, concretamente 10, 20 y más de 100 veces menor para los linajes 1, 2 y 3, respectivamente (Tabla 10). Esto denota que, tras la evolución, todos los virus han aumentado notablemente su virulencia en células sanas (Figura 21).



**Figura 21.** Representación gráfica de la viabilidad celular tras la infección con el ancestro y los virus evolucionados. Se infectaron células MRC5 con MOI decrecientes de los virus indicados durante 48h. Posteriormente, se midió la viabilidad celular determinándose la  $EC_{50}$  para cada virus. En rojo el ancestro, círculo negro L1, círculo blanco L2, triángulo L3.

Tabla 10. Dosis Media Efectiva (EC<sub>50</sub>)

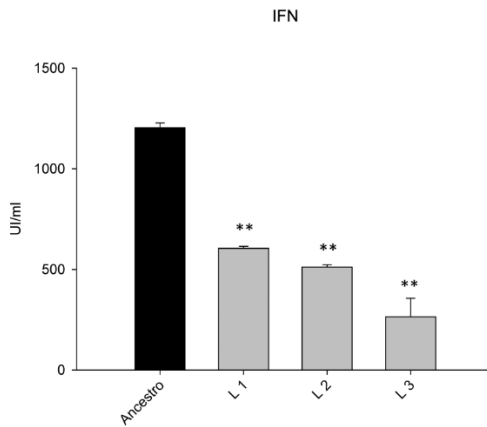
Células	Virus	EC <sub>50</sub> (PFU/célula)	IC95% EC <sub>50</sub>
MRC5	Ancestro	$2.8 \times 10^{-2}$	$(2.7-3.0) \times 10^{-2}$
	L1	$2.3 \times 10^{-3}$	$(2.3-2.4) \times 10^{-3}$
	L2	$1.4 \times 10^{-3}$	$(1.3-1.4) \times 10^{-3}$
	L3	$1.7 \times 10^{-5}$	$(1.5-1.9) \times 10^{-5}$

### 3.1.2 Cuantificación de la secreción de IFN

Como ya hemos mencionado, las propiedades oncolíticas del virus VSV-MΔ51-GFP le vienen dadas por su incapacidad para bloquear la síntesis de IFN, resultando deletéreo en células sanas. El hecho de que los virus evolucionados hayan aumentado su virulencia en células competentes para la síntesis de IFN sumado al incremento de título que se observa tras dos ciclos de infección, puede ir asociado a un aumento en la capacidad de bloquear esta citoquina. Para confirmarlo, cuantificamos la producción de IFN en células MRC5 tras la infección con el virus ancestral o con los tres linajes evolucionados. Para ello, se realizaron infecciones de células MRC5 con los cuatro virus a MOI 3, se recogieron los sobrenadantes a las 16 hpi y por ELISA se cuantificó el IFN. Se realizaron tres infecciones independientes para cada virus.

Los resultados muestran una disminución estadísticamente significativa en la síntesis de IFN tras la infección con los tres linajes respecto a el

virus ancestral (test-t;  $**p < 0.01$ ; Figura 22). Concretamente se detecta 2, 2.5 y 4.5 veces menos IFN en la infección con los linajes 1, 2 y 3, respectivamente, que durante la infección con el virus ancestral. Estos resultados indican que la evolución ha modificado el comportamiento del virus aumentando su capacidad para bloquear la síntesis de IFN y por tanto, mostrando un fenotipo más virulento en células sanas.



**Figura 22.** Secreción de IFN tras la infección de células MRC5 con los virus evolucionados (gris) y el virus ancestral. Se evaluó las diferencias de los linajes frente al virus ancestral mediante un test-t (\*\*:  $p < 0.01$ ). Las barras de error indican el SEM.



## 3.2 Análisis genotípico de los virus evolucionados

### 3.2.1 Secuenciación por Sanger

Como se ha descrito en numerosos trabajos (Cuevas *et al.* 2002; Cuevas *et al.* 2009; Novella *et al.* 2004; Remold *et al.* 2008) y además hemos corroborado en esta tesis, la adaptación de un virus de ARN a un determinado hospedador genera cambios fenotípicos, que se acompañan lógicamente de cambios en el genoma del virus. En este caso, el virus VSV-MΔ51-GFP presenta dos posibles dianas susceptibles de cambios: por un lado el gen reportero GFP, un gen no necesario para la replicación viral y que por lo tanto, podría sufrir deleciones totales o parciales. Por otro, la deleción M51, en un ambiente donde la deleción reduce la replicación del virus, cabría esperar la aparición de cambios compensatorios que incrementaran la funcionalidad de la proteína M.

Para la determinación de posibles cambios en los genomas virales, se procedió a la secuenciación de los genomas completos, incluidos el Leader y el Tráiler, del pase 20 de los tres virus evolucionados, así como del virus ancestral por Sanger. Sorprendentemente, sólo se encontraron 4 cambios, todos en la proteína P: 3 en L1 (uno sinónimo y dos no sinónimos), un cambio en L2 (no sinónimo), y ningún cambio en L3 (Figura 23). Estos resultados, a priori, nos dejan sin argumentos moleculares para explicar los cambios observados en virulencia e inhibición de la síntesis de IFN de los virus evolucionados.

GEN	P				GFP
Nt subst	A1898C	G1900A	A2019C	T2076C	C4733A
Aa subst	Met <sub>168</sub> Leu	Met <sub>168</sub> Ile	Gln <sub>208</sub> Pro	Ser <sub>227</sub> Ser	His <sub>30</sub> Gln
CODÓN	ATG-->CTG	ATG-->ATA	CAA-->CCA	TCT-->TCC	CAC-->CAA
MRC5_L1					
MRC5_L2					
MRC5_L3					

**Figura 23. Sustituciones nucleotídicas en los linajes evolucionados.** Para cada mutación, se muestra el cambio nucleotídico (nt) así como el cambio de aminoácido (aa). En azul las sustituciones sinónimas y en rojo las no-sinónimas.

### 3.2.2 Secuenciación masiva

Llegados a este punto, ante la falta de evidencias moleculares que expliquen el comportamiento fenotípico de los clones evolucionados pasamos a analizar las poblaciones virales mediante métodos de secuenciación masiva. Estas plataformas son capaces de secuenciar múltiples cadenas de ADN al mismo tiempo, devolviéndonos prácticamente todas las secuencias de los clones que conviven en una misma población viral. De esa manera, tendremos una idea de si se dan clones a baja frecuencia en posiciones que pudieran estar implicadas en el comportamiento observado.

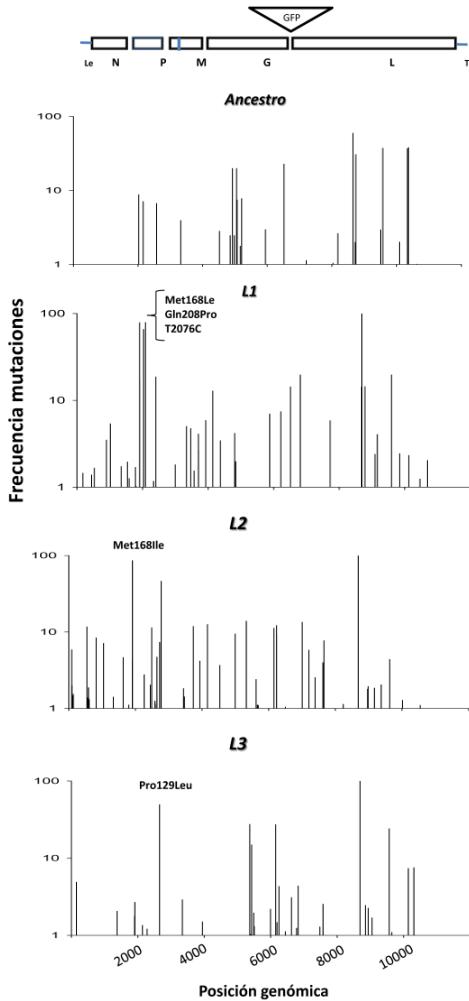
La secuenciación se llevó a cabo utilizando la plataforma MiSeq Personal Sequencer de (Illumina Inc., San Diego, CA, EEUU). Este experimento

fue llevado a cabo gracias a la colaboración de la Fundación del Hospital clínico de Valencia (INCLIVA) que realizó la preparación de las librerías y las reacciones de secuenciación, y al procesado bioinformático realizado por el Dr. José Manuel Cuevas (Instituto Cavanilles).

Tras el análisis de los resultados se observa que los linajes L1 y L2 presentan mayor variabilidad mientras que L3 presenta un perfil muy similar al ancestro (Figura 24). En L1 y L2 tal y como habíamos detectado por Sanger encontramos a elevada frecuencia tres mutaciones en la proteína P, concretamente para L1 los cambios (Met168Leu) y (Gln208Pro) ambos a una frecuencia del 78%, y en L2 el cambio (Met168Ile) al 86%. Los cambios en la metionina 168 que se producen en ambos linajes podrían considerarse un caso de evolución paralela ya que están afectando al mismo aminoácido y en los dos casos el cambio es hacia aminoácidos de las mismas características. En L3, sin embargo, este cambio aparece a una frecuencia muy baja (2.7%). En L3 aparece un cambio en la proteína M (Pro129Leu) a una frecuencia del 49%, que se da en los otros dos linajes (Figura 24). Por otro lado, observamos que la mutación G8649A, un cambio sinónimo que se encontraba en forma de polimorfismo en el ancestro a una frecuencia del 59%, se ha fijado tras la evolución apareciendo en los tres linajes a una frecuencia del 99% (Figura 24).

En principio estos resultados nos dejan de nuevo sin argumentos moleculares que expliquen el fenotipo observado en los tres linajes. En

vista de que el linaje 3 parece ser el más conservado, a pesar de presentar un fenotipo más acusado tanto en toxicidad como en inhibición de la síntesis de IFN pasaremos a centrarnos en este linaje. Procederemos a desmenuzar la población en busca de algún clon, quizás a tan baja frecuencia como para no poder detectarlo molecularmente, que nos explique las características fenotípicas observadas.

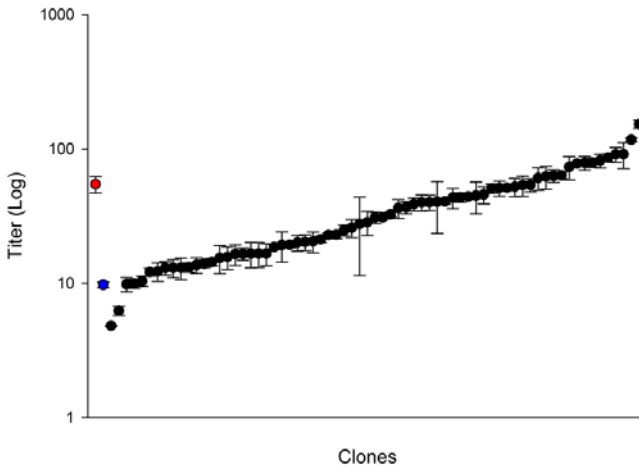


**Figura 24. Frecuencia de mutaciones en las cuatro poblaciones virales.** Está representada la frecuencia a la que se encuentran los diferentes cambios distribuidos en el genoma de VSV-MΔ51 para el ancestro, L1, L2 y L3. No se representan los cambios encontrados en el gen reportero GFP.

### **3.3 Selección de clones biológicos y determinación del título viral**

Se aislaron 70 clones individuales de L3 mediante dilución límite. Para ello, se realizaron infecciones en células BHK-21 con varias diluciones del virus en placas de 96 pocillos. A las 24 horas, se seleccionó la dilución en la cual menos de un 30 % de los pocillos se encontraban infectados, volvieron infectarse placas de 96 pocillos con la dilución seleccionada y se recogieron los sobrenadantes de aquellos pocillos infectados, cada pocillo se consideró un clon individual.

Se realizaron infecciones de células MRC5 con los 70 clones por triplicado y a 24 hpi se obtuvieron los títulos virales y se determinó el incremento de título tras 24 horas respecto al inóculo inicial. En la Figura 25 se representa el incremento del título para los 70 clones, L3 y el ancestro. Se observa una amplia variación reproducible del título en los clones, abarcando desde valores inferiores a los obtenidos para L3 hasta valores superiores. Posteriormente se seleccionaron diez clones situados en los extremos de la distribución, cinco con mayor incremento del título (clones: 20, 21, 22, 38 y 65) y cinco con menor incremento (clones: 2, 7, 33, 43 y 53), con el objetivo de determinar si existía alguna correlación entre la capacidad replicativa (incremento de título) y la capacidad de inhibir la síntesis de IFN.



**Figura 25.** Incremento del título de los 70 clones, L3 y el ancestro ordenados por magnitud. En negro los 70 clones, en rojo el L3 y en azul el ancestro.

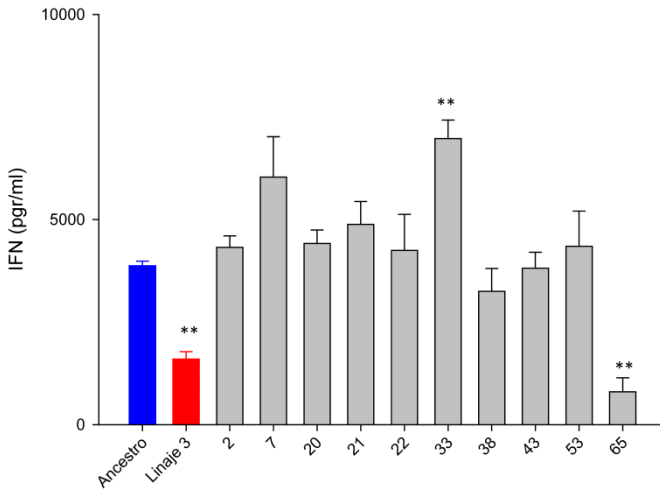
### 3.4 Cuantificación de la secreción de IFN de los clones seleccionados

Procedimos a la cuantificación de la secreción de IFN para los diez clones seleccionados arriba, con la intención de determinar si una mayor eficacia de los virus (título) es debida a la capacidad de bloquear la síntesis de IFN. Para ello, nuevamente se realizaron infecciones de células MRC5 con cada clon a MOI 3 y a 16 hpi se recogieron los sobrenadantes y se cuantificaron por ELISA. Cada infección se realizó por triplicado. Como puede observarse en la Figura 26, de los 10 clones

seleccionados sólo el clon 65 presenta un comportamiento similar a L3 con un aumento significativo de la inhibición de la síntesis de IFN respecto al virus ancestral (test-t;  $p < 0.001$ ). Para el resto de clones la secreción de IFN tras la infección, no presenta diferencias significativas respecto al valor del virus ancestral (test-t;  $p > 0.1$ ), a excepción del clon 33 que presenta mayor secreción de IFN que el virus ancestral (test-t;  $p = 0.002$ ).

Con los datos obtenidos se determinó si existía correlación entre el incremento de título y la secreción de IFN, obteniéndose una correlación negativa moderada no significativa (Correlación Pearson,  $r = -0.45$ ;  $p = 0.096$ ), lo que parece indicar que una mayor capacidad de replicación de los clones no va fuertemente ligada a una mayor capacidad para bloquear la síntesis de IFN.





**Figura 26.** Secreción de IFN tras la infección de células MRC5 con el ancestro (negro), L3 (rayado) y los diez clones seleccionados (gris). Se evaluó la diferencia en secreción de IFN respecto al virus ancestral test-t (\*\*:  $p < 0.01$ ). Las barras de error indican el SEM.

### 3.5 Caracterización genotípica del clon 65

Los resultados obtenidos de los clones aislados son una representación gráfica de lo que ocurre en una población viral de un virus de ARN. Disponemos de una población con un fenotipo determinado (L3), compuesta por una diversidad de genomas que presentan fenotipos dispares donde encontramos clones con un comportamiento similar al ancestro, incapaces de bloquear la síntesis de IFN, junto con otros, como el clon 65, que sí inhiben la secreción de IFN. En el análisis

molecular de L3 no detectamos mutaciones tras la evolución, cuando sí se detectaba un cambio fenotípico claro respecto al virus ancestral. Con el objetivo de poder caracterizar a nivel molecular el clon 65, con un fenotipo más parecido a L3, secuenciamos su genoma completo. La secuenciación mostró varios cambios, concretamente, un cambio situado en la región intergénica entre las proteínas N y P, un cambio en la proteína P y otro en la proteína M, además de dos cambios en el gen reportero (Figura 27).

GEN		P	M	GFP	
<b>Nt subst</b>	T1369C	G1891A	C2635U	C4760A	G5253A
<b>Aa subst</b>		Val <sub>166</sub> Ile	Pro <sub>129</sub> Leu	His <sub>40</sub> Asn	Gly <sub>204</sub> Glu
<b>CODÓN</b>		GTC→ATC	CCA→CTA	CAC→AAC	GGA→GAA

**Figura 27. Sustituciones nucleotídicas del clon 65.** Para cada mutación se muestra el cambio nucleotídico (nt) así como el cambio de aminoácido (aa).

Era de esperar la presencia de cambios en el genoma de un clon aislado individualmente dada la heterogeneidad genética que existe en la población que compone un virus de ARN. Con la secuenciación del clon 65 nuestro objetivo era detectar si alguno de los cambios que encontraríamos coincidía con los cambios encontrados a mayor

frecuencia durante la secuenciación masiva. Para así, poder relacionarlo con el fenotipo que observamos para este clon concretamente.

En un principio, pensamos que el cambio más interesante podría ser la mutación C2635U de la proteína M. Por un lado, según los resultados de secuenciación masiva se encuentra a una frecuencia del 49% en la población. Por otro, la proteína M de VSV es la que presenta la función de bloquear la síntesis de IFN según está descrito en la literatura (Reis *et al.* 2009; Rose *et al.* 2001). Sin embargo, nos resultaba discordante que dicha mutación no estuviera presente en L1 y L2, ya que también han aumentado su capacidad para inhibir IFN.

Para comprobar si existía relación entre la mutación C2639U y la secreción de IFN se retomaron los 9 clones aislados para los cuales se midió la secreción de IFN junto con el clon 65 (Figura 26) y se secuenció la posición C2639U para cada clon. Los resultados detectaron que los clones 21 y 38 también presentan la mutación y sin embargo, no presentan cambios en la síntesis de IFN con respecto al ancestro (Figura 26). Por tanto, la mutación C2639U queda descartada como posible causa del efecto observado.

Por otro lado, se secuenciaron las posiciones G1891A, A1898C y G1900A, todas de la proteína P. Estas mutaciones curiosamente aparecen en el clon 65 (Figura 27), L1 y L2 (Figura 24) respectivamente. Además, en L1 y L2 aparecen como mutaciones fijadas no sinónimas. Los resultados no detectan ninguno de esos cambios en los clones

analizados, devolviéndonos la evidencia de que en este caso puede ser la proteína P la clave del fenotipo que observamos.

### 3.6 Comportamiento del clon 65 aislado o en la población

A continuación pasamos a analizar en profundidad el comportamiento del clon 65 cuando se encuentra aislado o mezclado con la población total. Según los resultados de la secreción de IFN, el clon 65 parece estar implicado en la inhibición de la secreción de IFN y sin embargo, su frecuencia en la población es muy baja: 1/70 (1.4%). Nuestro objetivo es intentar explicar por qué un clon que parece tener un efecto beneficioso se mantiene a tan baja frecuencia. Para ello, realizamos coinfecciones de células MRC5 con pares de virus a alta MOI (3 + 3), en las que se diera un solo ciclo de infección. Las infecciones fueron: ancestro, L3, mezcla *ancestro:L3* (1:1) y mezcla *ancestro:clon 65* (1:1). A las 16 hpi se recogieron los sobrenadantes y por un lado se midieron los títulos alcanzados para cada infección y por otro se cuantificó la secreción de IFN.

El análisis de los títulos virales obtenidos confirma que tanto L3 como el clon 65 presentan títulos significativamente superiores al ancestro, (test-t;  $p < 0.001$ , en ambos casos). Sin embargo, cuando ambos virus son mezclados con el virus ancestral, a pesar de obtener un resultado significativamente mayor en título que para el ancestro (test-t;  $p < 0.05$ ,

en ambos casos), no llega a alcanzar el título que cabría esperar. Es decir, el clon 65 alcanza un título de  $(1.18 \pm 0.04) \times 10^8$  PFU/mL y el ancestro  $(3.03 \pm 0.07) \times 10^7$  PFU/mL. Si bien cabría esperar que la infección con ambos virus en proporción 1:1 nos devolviera un título de  $1.53 \times 10^8$  PFU/mL, la mezcla *ancestro:clon 65*, tiene como título  $4.77 \times 10^7$  PFU/mL, tres veces menos de lo esperado (test-t;  $p < 0.009$ ). Y lo mismo ocurre para la mezcla *ancestro:L3*, donde obtenemos un título 3.9 veces menor del esperado (test-t;  $p < 0.001$ ; Figura 28).

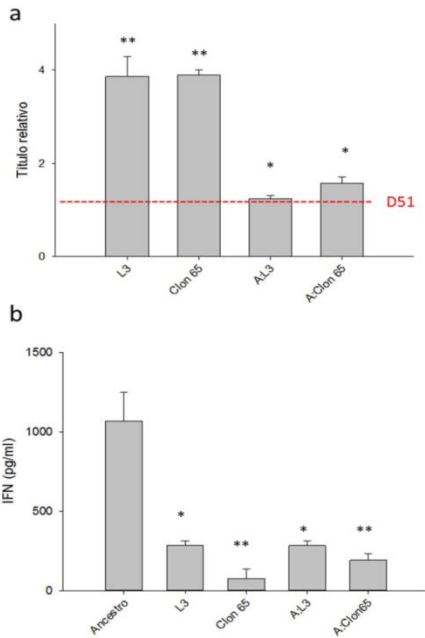
Estos datos indican que se está dando un fenómeno de antagonismo entre ambos virus a nivel de eficacia. De manera especulativa, ya que carecemos de datos experimentales, podríamos pensar en dos aproximaciones diferentes que expliquen este fenómeno. En primer lugar sabemos que el virus ancestral al inicio de la infección crece más rápido que L3 (Figura 20). Durante esta etapa inicial y dado que no es capaz de inhibir los mecanismos antivirales, al menos la síntesis de IFN, se podrían estar activando en la célula mecanismos de defensa que ralentizarían el crecimiento de L3 posteriormente. Es decir, el virus ancestral podría estar produciendo un preaviso en la célula, de manera que al llegar L3, a pesar de inhibir la síntesis de IFN, su crecimiento se viera ralentizado por la presencia ya en el medio de IFN u otra sustancia antiviral. Otra hipótesis podría ser que cuando ambos virus co-infectan una misma célula, de algún modo, compitan por la polimerasa más eficiente saturándola, lo que podría producir una reducción de su

rendimiento. En resumen, esta incógnita deja paso a futuros trabajos en los que se analizarán en profundidad cada una de estas hipótesis.

Por otro lado el análisis de la secreción de IFN para las diferentes infecciones indica que la inhibición de la secreción de IFN se mantiene en el mismo rango cuando testamos los virus L3 y clon 65 por separado, que cuando son mezclados con el ancestro. Las diferencias obtenidas respecto al virus ancestral, para L3 y para la mezcla *ancestro:L3* son estadísticamente significativos (test-t;  $p=0.045$ , en ambos casos), así como para el clon 65 y la mezcla *ancestro:clon 65* (test-t;  $p<0.001$ , en ambos casos; Figura 28). Es decir, en este caso no parece haber una disminución en la capacidad de inhibir IFN al mezclar estos virus con el ancestro, lo que indica que los virus L3 y clon 65 están complementando la incapacidad para inhibir IFN del ancestro.

Como ya hemos citado repetidamente, cuando hablamos de un virus de ARN no podemos referirnos a una unidad sino a una población heterogénea de genomas. En este caso, se dan dos variantes claras, los clones supresores de IFN (S) y los no supresores (N). Los clones S en ausencia de IFN se encuentran a muy baja frecuencia porque su eficacia en ese ambiente es baja, como se ha visto en la infección a 6h. Los clones N, sin embargo, presentan mayor eficacia en ausencia de IFN (Figura 20). ¿Qué ocurre cuando empieza a producirse IFN? Los clones S inhiben la secreción de IFN y por complementación genética los clones N se benefician, de manera que la población total va a ver aumentada

su eficacia. Por tanto, los clones S a pesar de encontrarse a baja frecuencia por complementación son capaces de producir un efecto global aumentando la eficacia de la población.



**Figura 28. Comportamiento del clon 65 así como L3 singularmente y mezclados con la población ancestral en un ciclo de infección. A: L3 (Mezcla 1:1 ancestro y L3), A: Clon 65 (mezcla 1:1 ancestro y clon 65). a) Títulos virales relativos al virus ancestral (D51) de los virus indicados. b) Secreción de IFN tras la infección.**

## 4. Discusión general

### 4.1 Mutaciones puntuales para el desarrollo de virus oncolíticos

La adaptación de un virus de ARN a un determinado hospedador tiene sus bases en modificaciones puntuales en el genoma del virus que parecen reproducirse para un mismo hospedador. Pero, ¿son esos cambios específicos de un hospedador determinado? ¿Podrían extrapolarse a hospedadores que comparten características semejantes como diferentes líneas de células tumorales? Estas fueron algunas de las cuestiones que nos planteamos al elaborar nuestra hipótesis. Si esto fuese así, podríamos usar los datos recogidos en experimentos de evolución en células tumorales para el desarrollo de virus potencialmente oncolíticos con carácter general.

Planteada la hipótesis elegimos una serie de mutaciones procedentes de experimentos de evolución que compartían la característica de haber aparecido repetidamente (mutaciones convergentes) durante la evolución. Realizamos un primer análisis, basado en los tamaños de calva, en el que pudiéramos seleccionar sólo aquellas mutaciones beneficiosas en células tumorales y deletéreas en células no tumorales. De ese análisis solamente dos mutantes parecían compartir estas características, ambas procedentes de experimentos de evolución en células BHK-21, pero en trabajos realizados en laboratorios diferentes (Novella *et al.* 1999; Cuevas *et al.* 2002). Curiosamente esas dos

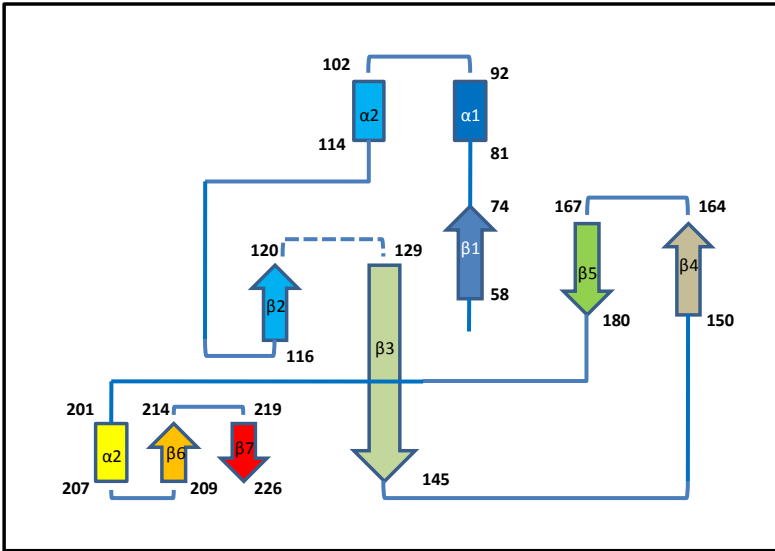


mutaciones se encuentran en un mismo codón, la prolina 120 de la proteína M, y siendo la proteína M diana para el desarrollo de virus oncolíticos nos pareció que podríamos estar ante algo interesante. Tratamos ambas mutaciones como la misma, desarrollando dos mutantes: en uno delecionamos la prolina y en el otro introdujimos un cambio drástico de aminoácido. Nuestro objetivo era obtener un mutante estable genéticamente y la deleción del aminoácido es un cambio genéticamente muy estable, como se ha demostrado en el capítulo 3. Sin embargo, no teníamos la certeza de que ese virus fuera a ser viable, por lo que se realizó en paralelo el mutante P120R. Los análisis con estos dos nuevos mutantes mostraron que la prolina 120 parece ser un aminoácido determinante para la funcionalidad de la proteína, ya que su deleción completa nos devolvió un virus deletéreo en cualquier tipo celular, siendo más suave este efecto cuando lo que hicimos fue realizar un cambio de aminoácido.

¿A qué podría deberse el comportamiento atenuado del mutante PΔ120 si su comportamiento parece ser independiente de la presencia de IFN? Si observamos con detalle la estructura de la proteína M (Gaudier *et al.* 2002; Gaudier *et al.* 2001), podemos distinguir que los dominios N-terminal (aminoácidos (aa) 1-180) y C-terminal (aa 201-229), se encuentran conectados por un péptido de 20 aa sin estructura secundaria alguna expuesto en superficie. Dentro del extremo amino, los aa del 120 al 129 forman un giro beta delimitado por las prolinas 120 y 129 (Figura 29). Ese giro beta contiene un pentapéptido

hidrofóbico responsable del ensamblaje de la membrana del virus, que interviene tanto en la interacción con la bicapa lipídica como en la formación de agregados entre proteínas M (Gaudier *et al.* 2001).

Es posible pues que la delección de la prolina 120 cause defectos en el ensamblaje de la membrana viral, produciéndose partículas virales defectuosas que resultan deletéreas en cualquier tipo celular. Sin embargo, el cambio de aminoácido que se introdujo en el mutante P120R no parece haber restado tanta eficacia al virus, y probablemente la atenuación que se observa en células normales, pueda venir dada por su incapacidad de inhibir la síntesis de IFN, más acusada que la que se observaba para el mutante P $\Delta$ 120.



**Figura 29. Diagrama de estructura de la proteína M.** Puede observarse el giro β entre los aa 120 y 129. En rectángulos están representadas las hélices α y en flechas las láminas β. Tomado de la publicación Gaudier *et al.* 2002.

Cuando pasamos a evaluar la virulencia de ambos virus comprobamos que la prolina 120 parece estar implicada en la eficacia del virus, pero no en la virulencia. En los dos mutantes se observó una virulencia similar a la del virus *wt*, tanto en células tumorales como en no tumorales y en conclusión, no podemos afirmar que alguno de los mutantes testados presente potencial oncolítico. Por lo tanto, la aproximación basada en el análisis de mutaciones puntuales

aparecidas en experimentos de evolución previos no ha dado resultados positivos.

Estos resultados hicieron plantearnos una nueva estrategia para el desarrollo de virus oncolíticos basándonos en una evolución experimental más focalizada, pero no obstante lo suficientemente general (el gen p53) para dar lugar a un potencial virus oncolítico de amplio espectro.

## **4.2 Virus más selectivos mediante evolución experimental**

El estudio de los virus de ARN como potenciales virus oncolíticos se encuentra ampliamente extendido en las últimas décadas. Son numerosos los trabajos publicados que dejan constancia de ello (Bell *et al.* 2014). Sin embargo, la aplicación de la evolución experimental en el campo está muy poco extendida, limitándose a unas pocas publicaciones. En este trabajo hemos demostrado cómo la evolución experimental puede resultar una herramienta valiosa para virus de ARN con dos aplicaciones en el campo de los virus oncolíticos: el desarrollo de virus selectivos y la evaluación de la estabilidad genética de un virus oncolítico.

Como ya hemos comentado anteriormente, los virus de ARN son idóneos para su uso en evolución experimental. Su elevada tasa de mutación los hace fácilmente adaptables. Esta característica nos ha

permitido el desarrollo de un virus potencialmente oncolítico, partiendo de un virus poco selectivo capaz de infectar cualquier tipo celular, concretamente la cepa *wt* de VSV. Tras el crecimiento continuado mediante pases de evolución en células con características tumorales (por su deficiencia en el gen supresor de tumores p53), hemos obtenido un virus selectivo para estas células, de importancia relevante, ya que, más de la mitad de las células tumorales presentan deficiencias funcionales en dicho gen (Hainaut *et al.* 2000; Hollstein *et al.* 1991; Hollstein *et al.* 1998). Este resultado abre, por tanto, una nueva ventana en el desarrollo de virus oncolíticos.

Durante las últimas décadas con el auge de la ingeniería genética, cientos de virus oncolíticos han sido desarrollados mediante estas técnicas produciéndose importantes avances en el campo. Sin embargo, la mayoría de estos trabajos están focalizados en abordar una cuestión concreta como la seguridad o la eficacia, quedando otras dificultades sin resolver. Las interacciones virus-hospedador son altamente complejas, lo que hace que sean particularmente difíciles de abordar. Cuando hablamos de interacciones virus-célula tumoral la situación se complica aún más, ya que las células tumorales varían ampliamente dependiendo del tipo de cáncer e incluso para el mismo tipo de cáncer varían de paciente a paciente (Burrell *et al.* 2013). Como hemos podido demostrar en este trabajo la evolución experimental permite el diseño de virus de más amplio espectro, dado que, durante

la evolución el virus se está adaptando al microambiente de esa célula con todos los fenómenos que lo componen.

Un campo de sumo interés en experimentos futuros podría ser el diseño de un virus selectivo para cada paciente, algo que constituiría un gran avance en este tipo de terapia. En este trabajo hemos demostrado que el uso de la evolución experimental puede proporcionar la clave que nos acerque un paso más al desarrollo de virus selectivos para un tipo de tumor concreto. Podría intentarse la evolución del virus en las propias células del paciente. Incluso en el intento de dar todavía un paso más, sería de sumo interés la evolución experimental en explantes tumorales de los propios pacientes, a modo terapia personalizada. Experimentos con explantes de pacientes ya se han llevado a cabo para testar la eficacia de un virus oncolítico, como ejemplo Kim *et al.* (2007) con el virus vaccinia WR-delB18R.

### **4.3 Bases moleculares del proceso adaptativo**

Hemos visto como la evolución experimental ha constituido una herramienta útil en el desarrollo de virus selectivos por adaptación a un ambiente concreto. Hasta aquí, nuestros resultados no divergen de los que podemos encontrar en la literatura, un virus de ARN se adapta a un nuevo hospedador aumentando su eficacia en ese nuevo hospedador pagando un coste en términos de eficacia biológica en

otros hospedadores (Cuevas *et al.* 2009; Novella 2004; Turner *et al.* 2000). Sin embargo, en el estudio de las bases moleculares de la adaptación encontramos algunas divergencias con respecto a otros trabajos publicados (Cuevas *et al.* 2002; Novella *et al.* 1999). Por un lado, tras la evolución de cuatro linajes de VSV en células p53ko, no hemos encontrado mutaciones convergentes, aunque bien es cierto, que de los cuatro linajes sólo uno de ellos presenta signos claros de adaptación. Llegados a este punto quizás sería interesante profundizar introduciendo puntualmente las diferentes mutaciones encontradas en L3 y comprobar si alguno de los mutantes simples comparte las características observadas para L3. Por otro lado, la evaluación de mutaciones puntuales procedentes de diversos experimentos de evolución experimental, en el cribado del panel de mutantes simples, nos lleva otra vez a pensar que, las propiedades observadas tras la adaptación no van ligadas a cambios puntuales en el genoma del virus, sino que la epistasia está jugando un papel clave. Hay numerosos ejemplos donde se muestran los efectos de la epistasia en diferentes virus de ARN (Bonhoeffer *et al.* 2004; Elena *et al.* 2010; Bedhomme *et al.* 2015). En general, está demostrado cómo la presencia de unas mutaciones influye sobre otras aumentando o disminuyendo el efecto de la propia mutación dependiendo de si se da epistasia positiva o negativa, un ejemplo más lo hemos observado en este trabajo con el virus U2617G/A3802. Brun *et al.* (2010), demuestran la capacidad oncolítica que proporcionan estos dos cambios en el virus Maraba, sin embargo, los mismos cambios en otro fondo genético como VSV nos

devuelven un virus de una toxicidad similar al virus VSV wt, perdiendo esa capacidad oncolítica.

Una explicación a la ausencia de mutaciones paralelas en nuestro trabajo podría ser la ausencia de presión selectiva durante la evolución. p53 es un gen implicado en la respuesta antiviral de la célula induciendo apoptosis (Takaoka *et al.* 2013). La evolución en células p53*ko* ha permitido el crecimiento continuado del virus en un ambiente relajado, es decir con menor presión selectiva, por lo que se toleraría una serie de cambios que probablemente no serían tolerados en células p53 competentes. Sin embargo, en los trabajos en los que se describe evolución paralela (Cuevas *et al.* 2002; Remold *et al.* 2008, Novella *et al.* 1999) hubo selección direccional, lo que probablemente permitió la aparición de mutaciones convergentes. Algo que también se ha observado en este trabajo durante la evolución del virus VSV-MΔ51-GFP en células competentes para la síntesis de IFN. Concretamente con la aparición de un cambio en la metionina 168 de la proteína P en dos linajes diferentes.

### **4.3 Importancia de la estabilidad genética de un virus de oncolítico**

Uno de los factores clave en el desarrollo de virus oncolíticos es la seguridad. Los virus de ARN son idóneos como virus oncolíticos, por su



elevada capacidad de replicación, lo que permite obtener cantidades elevadas de virus para su administración a pacientes (Rose *et al.* 2001), así como por su elevada tasa de mutación, lo que les hace adaptables, propiedad interesante en el desarrollo de virus oncolíticos selectivos mediante evolución dirigida. Sin embargo, esa elevada tasa de mutación puede tener consecuencias negativas durante la replicación del virus tras su administración a pacientes, o en los procesos de fabricación del virus a gran escala. Con este trabajo hemos demostrado cómo un virus oncolítico de referencia, tras algunos pases de devolución en células sanas, ha modificado su comportamiento hacia un estado más virulento, además de haber aumentado su capacidad de replicación en estas células, transformándose en un virus capaz de replicar más eficazmente en células no tumorales.

El virus VSV-M $\Delta$ 51-GFP presenta la delección total del codón 51 de la proteína M, un cambio que como es de esperar y se ha demostrado tras la evolución, es genéticamente estable. No obstante, no está exento de la aparición de cambios que compensen la pérdida de función causada por esta delección, fenómeno que no había sido estudiado hasta ahora en este virus de referencia como oncolítico. Para VSV está ampliamente descrito que la proteína M es la responsable de la inhibición de la síntesis de IFN, por lo que cabría esperar que esos cambios aparecieran en la proteína M (Black *et al.* 1993; Ahmed *et al.* 2003). Sin embargo, en este caso los cambios que apuntan a la recuperación de esta pérdida de función parecen estar dándose en la

proteína P. Curiosamente, si observamos otros virus de la misma familia, como puede ser el virus de la rabia, la proteína P es la responsable de la inhibición de la síntesis de IFN, interfiriendo en la fosforilación de IRF3 y en la síntesis del factor de transcripción STAT-1 (Faul *et al.* 2009). Queda pendiente para futuros trabajos la caracterización de esas mutaciones en presencia de la delección M51 y su implicación en el bloqueo de la síntesis de IFN.

En conclusión, los virus oncolíticos como cualquier otro agente biológico usado para terapia en humanos, deberían pasar unos rigurosos controles que aseguren la estabilidad genética post-producción, demostrando que una posible inestabilidad no afectaría negativamente a la producción, así como, a la consistencia del producto. Para ello, un control excelente puede ser la aplicación de la evolución experimental, sometiendo al virus a pases sucesivos en un determinado hospedador y posteriormente, determinando su estabilidad, no sólo por secuenciación del genoma viral, sino también mediante el análisis detallado de la eficacia de las subpoblaciones virales y la posible susceptibilidad de reversión fenotípica. Este es un método ampliamente usado en la producción de vacunas donde podemos encontrar múltiples ejemplos. Rezapkin *et al.* (1994) por ejemplo, sometieron a Sabin 1, una cepa de poliovirus atenuada para vacuna, a 10 pases de evolución en dos tipos celulares diferentes, encontrando hasta 8 cambios tras la evolución, algunos de ellos relacionados con un aumento de neurovirulencia del virus en monos.

Otro ejemplo más reciente es el de Mantel *et al.* (2011). En este caso se trataba de una vacuna oral con virus vivos atenuados, concretamente del virus dengue. Realizaron 10 pases de evolución en células Vero y tras la evolución caracterizaron molecularmente, así como, fenotípicamente los virus, no encontrando evidencias de modificaciones que afectaran al fenotipo del virus.



**CONCLUSIONES**

---



1. Mutaciones en el codón 120 de la proteína M de VSV disminuyen su eficacia, así como, la capacidad de Inhibir la síntesis de IFN, pero mantienen su virulencia, demostrando que la pérdida de eficacia de VSV no siempre va ligada a una disminución de la toxicidad del virus.
2. La evolución experimental permite el desarrollo de virus oncolíticos. En concreto, la evolución en células p53 *ko* nos ha permitido el desarrollo de un virus con capacidad oncolítica no sólo en cualquier cultivo celular deficiente en P53, sino en tumores sólidos implantados en ratones constituidos por células deficientes en P53.
3. La evolución de VSV bajo presión selectiva, como ocurren en células IFN competentes, tiene como consecuencia la aparición de mutaciones convergentes.
4. El virus oncolítico VSV-M $\Delta$ 51-GFP ha demostrado ser un virus genéticamente estable tras 20 pases de evolución en células competentes para la síntesis de IFN, pero fenotípicamente inestable, demostrando la compleja relación genotipo-fenotipo que puede existir en virus de ARN.
5. La proteína P de VSV parece estar implicada en la recuperación de la capacidad de inhibir el IFN, compensando así en parte el efecto de la delección M51.
6. Clones de VSV presentes a muy baja frecuencia en una población viral son capaces de determinar el fenotipo de la población.





---

## **BIBLIOGRAFÍA**



- Acosta-Leal, R. y Xiong, Z. 2013. Intrahost mechanisms governing emergence of resistance-breaking variants of Potato virus Y. *Virology* 437: 39-47.
- Agudelo-Romero, P., de la Iglesia F. y Elena S. F. 2008. The pleiotropic cost of host specialization in Tobacco etch potyvirus. *Infect. Genet. Evol.* 8: 806-814.
- Ahmed, M., McKenzie, M.O., Puckett, S., Hojnacki, M., Poliquin, L. y Lyles, D. 2003. Ability of the matrix protein of vesicular stomatitis virus to suppress beta interferon gene expression is genetically correlated with the inhibition of host RNA and protein synthesis. *J. Virol.* 77: 4646–4657.
- Anderson, J. P., Daifuku, R., y Loeb, L. A. 2004. Viral error catastrophe by mutagenic nucleosides. *Annu. Rev. Microbiol.* 58: 183-205.
- Ayala-Bretón, C., Barber, G.N., Russell, S.J., y Peng, K. Y. 2012. Retargeting vesicular stomatitis virus using measles virus envelope glycoproteins. *Human Gene Therapy* 23: 484–491.
- Balachandran, S. y Barber, G.N. 2000. Vesicular stomatitis virus (VSV) therapy of tumors. *IUBMB Life* 50: 135–138.
- Banaszynski, L.A., Sellmyer, M.A., Contag, C.H., Thomas, J. y Thorne S.H. 2008. Chemical control of protein stability and function in living animals. *Nat. med.* 14: 1123–1127.

- Barber, G. N. 2004. Vesicular stomatitis virus as an oncolytic vector. *Viral Immunol.* 17: 516–527.
- Batenchuk, C., F. Le Boeuf, Stubbert, L., Falls, T., Atkins, H. L., Bell, J.C. y Conrad, D.P. 2013. Non-replicating rhabdovirus-derived particles (NRRPs) eradicate acute leukemia by direct cytolysis and induction of antitumor immunity. *Blood Cancer Journal* 11: e201
- Bauzon, M. y Hermiston, T.W. 2012. Oncolytic viruses: the power of directed evolution. *Advances in Virology* 2012: 586389.
- Bedhomme, S., Hillung y J., Elena, S. 2015. Emerging viruses: why they are not jacks of all trades? *Curr. Opin. Virol.* 10: 1-6.
- Bell, J. y McFadden, G. 2014. Viruses for tumor therapy. *Cell Host & Microbe* 15: 260–265.
- Berridge, M., Herst, P., Tan, A. 2005. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review* 11: 127-152
- Black, B., Rhodes, R., McKenzie, M., Lyles, D. 1993. The role of vesicular stomatitis virus matrix protein in inhibition of host-directed gene expression is genetically separable from its function in virus assembly. *J. Virol.* 67: 4814–4821.

Bonhoeffer, S., Chappey, C., Parkin, N.T., Whitcomb, J.M. y Petropoulos, C.J. 2004. Evidence for positive epistasis in HIV-1. *Science* 306: 1547-1550.

Bordería, A.V., Isakov, O., Moratorio, G., Henningsson, R., Agüera-González, S., Organtini, L., Gnädig, N., Blanc, H., Alcover, A., Hafenstein, S., Fontes, M., Shomron, N., Vignuzzi, M. 2015. Group selection and contribution of minority variants during virus adaptation determines virus fitness and phenotype. *PLoS Pathog.* 11: e1004838.

Bracho, M. A. 2003. Caracterizació molecular i anàlisi de la dinàmica poblacional de recuperació d'eficàcia del virus de l'estomatitis vesicular. Tesis doctoral, Universidad de Valencia.

Brun, J., McManus, D., Lefebvre, C., Hu, K., Falls, T., Atkins, H., Bell, J., McCart, J.A., Mahoney, D. y Stojdl, D. 2010. Identification of genetically modified maraba virus as an oncolytic rhabdovirus. *Molecular Therapy* 18: 1440–1449.

Butcher, D. 1995. Muller's ratchet, epistasis and mutation effects. *Genetics* 141: 431-437.

Buckling, A., Craig, M.R., Brockhurst, M. A. y Colegrave, N. 2009. The beagle in a bottle. *Nature* 457: 824–829.

Burrell, R. A., McGranahan, N., Bartek, J. y Swanton, C. 2013. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature* 501: 338–345.

Černý, J., Černá, B., Valdés, J., Grubhoffer, L., Růžek, D. 2014. Evolution of tertiary structure of viral RNA dependent polymerases. *PLoS One* 9: e96070.

Chao, L. 1990. Fitness of RNA virus decreased by muller's ratchet. *Nature* 348: 454-455.

Chao, L. (1991). Levels of selection, evolution of sex in RNA viruses, and the origin of life. *J. Theor. Bio.* 153: 229–246.

Critchley-Thorne, Rebecca J., Simons, D., Yan, N., Miyahira, A.K., Dirbas, F.M., Johnson, D.L. y Swetter, S.M. 2009. Impaired interferon signaling is a common immune defect in human cancer. *Prod. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 9010–5015.

Crotty, S., C. E. Cameron, y R. Andino. 2001. RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 6895-6900.

Cuevas, J. M., Elena, S.F. y Moya, A. 2002. Molecular basis of adaptive convergence in experimental populations of RNA viruses. *Genetics* 162: 533–542.

Cuevas, J. M., Moya, A. y Sanjuán, R. 2009. A genetic background with low mutational robustness is associated with increased adaptability to a novel host in an RNA virus. *Journal of Evolutionary Biology* 22: 2041–2048.

Desai, M., Weissman, D., Feldman, M. 2007. Evolution can favor antagonistic epistasis. *Genetics* 177: 1001–1010.

Dessau, M., Goldhill, D., McBride, R., Turner, P.E., Modis, Y. 2012. Selective pressure causes an RNA virus to trade reproductive fitness for increased structural and thermal stability of a viral enzyme. *PLoS Genet.* 8: e1003102.

Dietzschold, B., Wiktor, T.J., Macfarlan, R. y Varrichio, A. 1982. Antigenic structure of rabies virus glycoprotein: ordering and immunological characterization of the large cns cleavage fragments. *J. Virol.* 44: 595–602.

Dock, G. 1904. The Influence of complicating diseases upon leukemia. *Am. J. Med. Sci.* 127: 561–592.

Domingo, E. (2006). Quasispecies: concept and implications for virology. *Springer*.

Drake, J. W. y Holland, J. J. 1999. Mutation rates among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 13910-13913.

Duarte, E., Clarke, D., Moya, A., Domingo, E. y Holland, J.J. 1992. Rapid fitness losses in mammalian RNA virus clones due to Muller's ratchet. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6015-6019.

Dummer, R., Dobbeling, U., Geertsen, R., Willers, J., Burg, G. y Pavlovic, J. 2001. Interferon resistance of cutaneous t-cell lymphoma-derived clonal t-helper 2 cells allows selective viral replication. *Blood* 97: 523–527.

Dunn, G., Bruce, A., Sheehan, K., Shankaran, V., Uppaluri, R., Bui, J., Diamond, M., Koebel, C., Arthur, C., White, J. y Schreiber, R. 2005. A critical function for type I interferon in cancer immunoediting. *Nat. Immunol.* 6: 722–729.

Eigen, M., y Biebriche, C. 1988. Sequence space and quasispecies distribution. *RNA Genetics. Vol.III*

Elena, S. y Sanjuán, R. 2007. Virus Evolution: Insights from an experimental approach. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 38: 27–52.

Elena, S. y Lenski, R. 2003. Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. *Nat. Rev. Genet.* 4: 457-469.

Elena, S., Solé, R.V. y Sardanyés, J. 2010. Simple genomes, complex interactions: epistasis in RNA virus. *Chaos* 20: 026106.



Elena, S., González-Candelas, F., Novella, I., Duarte, E., Clarke, D., Domingo, E., Holland, J. y Moya, A. 1996. Evolution of fitness in experimental populations of vesicular stomatitis virus. *Genetics* 142: 673-679.

Engelman, A. y Cherepanov, P. 2014. Retroviral integrase structure and dna recombination mechanism. *Microbiol. Spectr.* 2: 1-22.

Faul, E. J., Lyles, D. S. y Schnell, M. J. (2009). Interferon response and viral evasion by members of the family rhabdoviridae. *Viruses* 1: 832–851.

Finkelshtein, D., Werman, A., Novick, D., Barak, S. y Rubinstein, M. 2013. LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 7306-7311.

Furió, V., Garijo, R., Durán, M., Moya, A., Bell, J. y Sanjuán, R. 2012. Relationship between within-host fitness and virulence in the vesicular stomatitis virus: correlation with partial decoupling. *J. Virol.* 86: 12228–12236.

Gao, Y., Whitaker-Dowling, P., Watkins, S.C., Griffin, J.A. y Bergman, I. 2006. Rapid adaptation of a recombinant vesicular stomatitis virus to a targeted cell line. *J. Virol.* 80: 8603–8612.

Garber, K. 2006. China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment. *Journal of the National Cancer Institute*. 98: 298-300.

Garland, T. y Rose, M.R. 2009. Experimental evolution. Berkeley: University of California Press.

Gaudier, M., Gaudin, Y. y Knossow, M. 2001. Cleavage of vesicular stomatitis virus matrix protein prevents self-association and leads to crystallization. *Virology* 288: 308-314.

Gaudier, M., Gaudin, Y. y Knossow, M. 2002. Crystal structure of vesicular stomatitis virus matrix protein. *EMBO J.* 21: 2886-2892.

Gerl, R. y Vaux, D.L. 2005. Apoptosis in the development and treatment of cancer. *Carcinogenesis* 26: 263-270.

Giedlin, M. A., Cook, D. y Dubensky, T. 2003. Vesicular stomatitis virus: an exciting new therapeutic oncolytic virus candidate for cancer or just another chapter from field's virology? *Cancer Cell* 4: 241-243.

Greene, I. P., Wang, E. Deardorff, E.R., Milleron, R., Domingo, E. y Weaver, S.C. 2005. Effect of alternating passage on adaptation of sindbis virus to vertebrate and invertebrate cells. *J. Virol.* 79: 14253-14260.

Guo, J. y Xin, H. 2006. Chinese gene therapy. splicing out the west? *Science* 314: 1232-1235.

Gutiérrez, S., Michalakis, Y., Blanc, S. 2012. Virus population bottlenecks during within-host progression and host-to-host transmission. *Curr. Opi. Virol.* 2:546-555.

Hainaut, P. y Hollstein, M. 2000. p53 and Human Cancer: The first ten thousand mutations. *Advances in Cancer Research* 77: 81–137.

Han, G.Z. y Worobey, M. 2011. Homologous recombination in negative sense RNA viruses. *Viruses* 3: 1358-1373.

Hanada, K., Suzuki, Y. y Gojobori, T. 2004. A large variation in the rates of synonymous substitution for RNA viruses and its relationship to a diversity of viral infection and transmission modes. *Mol. Biol. Evol.* 21: 1074–1080.

Holland, J., de la Torre, J.C., Clarke, D.K. y Duarte, E. 1991. Quantitation of relative fitness and great adaptability of clonal populations of RNA viruses. *J. Virol.* 65: 2960–2967.

Hollstein, M., Moeckel, G., Hergenbahn, M., Spiegelhalder, B., Keil, M., Werle-Schneider, G., Bartsch, H. y Brickmann, J. 1998. On the origins of tumor mutations in cancer genes: insights from the p53 gene. *Mutation Research* 405: 145–154.

Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. y Harris, C. 1991. p53 mutations in human cancers. *Science* 253: 49–53.

Hsiung, G. D. 1989. The impact of cell culture sensitivity on rapid viral diagnosis: a historical perspective. *The Yale Journal of Biology and Medicine* 62: 79–88.

Igney, F. H. y Krammer, P.H. 2002. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *Journal of Leukocyte Biology* 71: 907–920.

Ikeda, K., Ichikawa, T., Wakimoto, H., Silver, J.S., T S Deisboeck, D., Finkelstein, G. R, Harsh, G.R., Louis, D.N., Bartus, R.T, Hochberg, F.H. y Chiocca, E.A. 1999. Oncolytic virus therapy of multiple tumors in the brain requires suppression of innate and elicited antiviral responses. *Nature Medicine* 5: 881–887.

Jenkins, G.M., Rambaut, A., Pybus, O.G. y Holmes, E.C. 2002. Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis. *J. Mol. Evol.* 54: 156–165.

Jordan, I., Northoff, S., Thiele, M., Hartmann, S., Horn, D., Howing, K. y Bernhardt, H. 2011. A Chemically defined production process for highly attenuated poxviruses. *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization* 39: 50–58.

Kan, S., Y. Wang, L. Sun, P. Jia, Y. Qi, J. Su, L. Liu, G. Yang, L. Liu, Z. Wang, J. Wang, G. Liu, N. Jin, X. Li, y Z. Ding. 2012. Attenuation of vaccinia tian tan strain by removal of viral TC7L-TK2L and TA35R genes. *PLoS One* 7: e31979.

Katsoulidis, E., Mavrommatis, E., Woodard, J., Shields, M., Sassano, A., Carayol, N., Sawicki, K., Munshi, H. y Plataniias, L. 2010. Role of interferon alpha (IFN alpha)-inducible Schlafen-5 in regulation of anchorage-independent growth and invasion of malignant melanoma cells. *J. Biol. Chem.* 285: 40333-40341

Kaplan, D., Shankaran, V., Dighe, A., Stockert, E., Aguet, M. y Old, L.J., Schreiber, R. 1998. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7556–7561.

Kirn, D., Wang, Y., Le Boeuf, F., Bell, J. y Thorne, S. 2007. Targeting of interferon-beta to produce a specific, multi-mechanistic oncolytic vaccinia virus. *PLoS Med.* 4: e353.

Kondrashov, A.S. 1988. Deleterious mutations and the evolution of sexual reproduction. *Nature* 336: 435-440.

Kopecky, S., Willingham, M. y Lyles, D. 2001. Matrix protein and another viral component contribute to induction of apoptosis in cells infected with vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* 75: 12169-12181.

Kyung, K.M., Breitbach, C.J., Moon, A., Heo, J., Kyoung, Y., Cho, M. y Lee, W.J. 2013. Oncolytic and immunotherapeutic vaccinia induces antibody-mediated complement-dependent cancer cell lysis in humans. *Science Translational Medicine* 5: 185ra63

Kuhn, I., Harden, P., Bauzon, M., Chartier, C., Nye, J., Thorne, S. y Reid, T. 2008. Directed evolution generates a novel oncolytic virus for the treatment of colon cancer. *PLoS One* 3: e2409.

Letchworth, G.J, Rodríguez, L.L. y Del Cbarrera, J. 1999. Vesicular stomatitis. *Vet. J.* 157: 239–260.

Li, J. y Zhang, Y. 2012. Biochemistry, genetics and molecular biology. Chapter 10.

Lichty, B.D., Power, A.T., Stojdl, D.F. y Bell, J.C. 2004. Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet. *Trends Mol. Med.* 10: 210–216.

Lyles, D. y Rupprecht, C.E. 2006. *Rhabdoviridae*, p 1363–1408. In Knipe DM, Howley PM (ed), *Fields virology*. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA.

Malkin, D. 2011. Li-Fraumeni syndrome. *Genes & Cancer* 2: 475–484.

Mantel, N., Girerd, Y., Geny, C., Bernard, I., Pontvianne, J., Lang, J. y Barban, V. 2011. Genetic stability of a dengue vaccine based on chimeric yellow fever/dengue viruses. *Vaccine* 29:6629-6635

Martínez, I. y Wertz, G.W. 2005. Biological differences between vesicular stomatitis virus indiana and new jersey serotype glycoproteins: identification of amino acid residues modulating pH-dependent infectivity. *J. Virol.* 79: 3578–85.

Mills, D. R., Peterson, R.L. y Spiegelman, S. 1967. An Extracellular darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58: 217-224.

Moore, A. E. 1951. Inhibition of growth of five transplantable mouse tumors by the virus of russian far east encephalitis. *Cancer* 4: 375–382.

Morimoto, K., Ohkubo, A. y Kawai, A. 1989. Structure and transcription of the glycoprotein gene of attenuated HEP-Flury strain of rabies virus. *Virology* 173: 465–477.

Muik, A., Stubbert, L.J., Jahedi, R.Z., Gei, Y., Kimpel, J., Dold, C., Tober, R., Volk, A., Klein, S., Dietrich, U., Yadollahi, B., Falls, T., Miletic, H., Stojdl, D., Bell, J.C. y von Laer, D. 2014. Re-engineering vesicular stomatitis virus to abrogate neurotoxicity, circumvent humoral immunity, and enhance oncolytic potency. *Cancer Research* 74: 3567–78.

Müller, U., Steinhoff, U., Reis, L.F., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R.M., Aguet, M. 1994. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264: 1918-1921.

Müller, M., Ibelgaufts, H., Kerr, I. 1994. Interferon response pathways--a paradigm for cytokine signalling? *J. Viral. Hepat.* 1: 87-103.

Nanni, P., Gatta, V., Menotti, L., De Giovanni, C., Lanzano, M., Palladini, A., Grosso, V., Dall'ora, M., Croci, S., Nicoletti, G., Landuzzi, L., Lezzi, M.,

Campadelli-Fiume, G. y Lollini, P.L. 2013. Preclinical therapy of disseminated HER-2(+) ovarian and breast carcinomas with a HER-2-retargeted oncolytic herpesvirus. *PLoS Pathogens* 9: e1003155.

Nickle, D.C, Rolland, M., Jensen, M.A., Pond, S.L., Deng, W., Seligman, M., Heckerman, D., Mullins, J.I. y Jojic, N. 2007. Coping with viral diversity in HIV vaccine design. *PLoS Computational Biology* 3: e75.

Novella, I. S. y Ebendick-Corpus, B.E. 2004. Molecular basis of fitness loss and fitness recovery in vesicular stomatitis virus. *Journal of Molecular Biology* 342: 1423–1430.

Novella, I., Elena, S., Moya, A., Domingo, E. y Holland, J. 1995c. Size of genetic bottlenecks leading to virus fitness loss is determined by mean initial population fitness. *J. Virol.*69: 2869-2872.

Novella, I. S., Hershey, C.L., Escarmis, C., Domingo, E. y Holland, J.J. 1999. Lack of evolutionary stasis during alternating replication of an arbovirus in insect and mammalian cells. *Journal of Molecular Biology* 287: 459–465.

Novella, I. S., Zarate, S., Metzgar, D. y Ebendick-Corp, B.E. 2004. Positive selection of synonymous mutations in vesicular stomatitis virus. *J. Mol. Biol.* 342: 1415–1421.



Novella, I.S. 2004. Negative effect of genetic bottlenecks on the adaptability of vesicular stomatitis virus. *Journal of Molecular Biology* 336: 61–67.

Novella, I.S., Quer, J., Domingo, E. y Holland, J.J. 1999. Exponential fitness gains of RNA virus populations are limited by bottleneck effects. *J. Virol.* 73: 1668–1671.

Obuchi, M., Fernández, M. y Barber, G.N. 2003. Development of recombinant vesicular stomatitis viruses that exploit defects in host defense to augment specific oncolytic activity development of recombinant vesicular stomatitis viruses that exploit defects in host defense to augment specific oncolytic. *J. Virol.* 77: 8843-8856.

Oldstone MBA (2010) Virus, Plagues and History. Oxford University Press.

Otsuki, K., Maeda, J., Yamamoto, H. y Tsubokura, M. 1979. Studies on avian infectious bronchitis virus (IBV). III. interferon induction by and sensitivity to interferon of IBV. *Archives of Virology* 60: 249–255.

Pagán, I., Alonso-Blanco, C. y García-Arenal, F. 2007. The relationship of within-host multiplication and virulence in a plant-virus system. *PLoS One* 2: e786.

Palmero, I. y Serrano, M. 2001. Induction of Senescence by oncogenic ras. *Methods Enzymol.* 333: 247–256.

Parato, K. A., Senger, D., Forsyth, P.A. y Bell, J.C. 2005. Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. *Nat. Rev. Cancer* 5: 965-976.

Pérez-Losada, M., Arenas, M., Galán, J., Palero, F. y González-Candelas, F. 2015. Recombination in viruses: mechanisms, methods of study, and evolutionary consequences. *Infect. Genet. Evol.* 30: 296-307.

Pol, J., Bloy, N., Obrist, F., Eggermont, A., Galon, J., Cremer, I., Erbs, P., Limacher, J.M., Preville, X., Zitvogel, L., Kroemer, G. y Galluzzi, L. 2014. Trial watch: oncolytic viruses for cancer therapy. *Oncoimmunology* 3: e28694

Pond, S.L., Murrell, B. y Poon, A.F. 2012. Evolution of viral genomes: interplay between selection, recombination, and other forces. *Methods in Molecular Biology* 856: 239–272.

Rainwater-Lovett, K., Pauszek, S.J., Kelley, W. y Rodríguez, L.L. 2007. Molecular epidemiology of vesicular stomatitis New Jersey virus from the 2004-2005 us outbreak indicates a common origin with mexican strains. *J. Gen. Virol.* 88: 2042–2051.

Reis, J., Mead, D., Rodríguez, L. y Brown, C.C. 2009. Transmission and pathogenesis of vesicular stomatitis viruses. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology* 2: 49–58.

Remold, S. K., A. Rambaut, y P. E. Turner. 2008. Evolutionary genomics of host adaptation in vesicular stomatitis virus. *Mol. Biol. Evol.* 25: 1138-1147.

Rezapkin, G.V., Chumakov, K.M., Lu, Z., Ran, Y., Dragunsky, E. y Levenbook, I. 1994. Microevolution of Sabin 1 strain in vitro and genetic stability of oral poliovirus vaccine. *Virology* 202: 370-378.

Rose, J. K. y Whitt, M. 2001. Rhabdoviridae: The viruses and their replication. Edited by Fields Virology. *Fourth ed.*

Rose, N.F., Marx, P.A., Luckay, A., Nixon, D.F., Moretto, W.J., Donahoe, S.M., Montefiori, D., Roberts, A., Buonocore, L. y Rose, J. K. 2001. An effective AIDS Vaccine based on live attenuated vesicular stomatitis virus recombinants. *Cell* 106: 539-49.

Russell, S.J., Peng, K.W. y Bell, J.C. 2012. Oncolytic virotherapy. *Nat. Biotechnol.* 30 (7): 658-670.

Sanjuán, R. y Domingo-Calap, P. (2011). Encyclopedia of life sciences.

Sanjuán, R., A. Moya, y S. F. Elena. 2004b. The distribution of fitness effects caused by single-nucleotide substitutions in an RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 8396-8401.

Sanjuán, R., Nebot, M., Chirico, N., Mansky, L. y Belshaw, R. 2010. Viral mutation rates. *J. Virol.* 84: 9733-9748.

Sanjuán, R. y Grdzelishvili, V. 2015. Evolution of oncolytic viruses. *Curr. Opin. Virol.* 13C: 1-5.

Sanjuán, R. 2012. From molecular genetics to phylodynamics: evolutionary relevance of mutation rates across viruses. *PLoS Pathog.* 8: e1002685.

Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P., Old, L. y Schreiber, R. 2001. IFN gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410: 1107–1111.

Sousa, R. 1996. Structural and mechanistic relationships between nucleic acid polymerases. *Trends in Biochemical Sciences* 21: 186–190.

Steel, J., Lowen, A.C. 2014. Influenza A virus reassortment. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 385: 377-401.

Steinhauer, D. A., E. Domingo, y J. J. Holland. 1992. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene* 122: 281-288.

Stojdl, D.F., Lichty, B.D., tenOever, B.R., Paterson, J.M., Power, A.T., Knowles, S., Marius, R., Reynard, J., Poliquin, L., Atkins, H., Brown, E.G., Durbin, R.K., Durbin, J.E., Hiscott, J. y Bell, J.C. 2003. VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell.* 4: 263-275.

- Sugio, K., Sakurai, F., Katayama, K., Tashiro, K., Matsui, H., Kawabata, K., Kawase, A., Iwaki, M., Hayakawa, T., Fujiwara, T. y Mizuguchi, H. 2011. Enhanced safety profiles of the telomerase-specific replication-competent adenovirus by incorporation of normal cell-specific microRNA-targeted sequences. *Clinical Cancer Research* 17: 2807-2818
- Sze, D.Y., Reid, T.R., Rose, S.C. 2013. Oncolytic virotherapy. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 24: 1115–1122.
- Takaoka, A., Hayakawa, S., Yanai, H., Stoiber, D., Negishi, H., Kikuchi, H., Sasaki, S., Imai, K., Shibue, T., Honda, K. y Taniguchi, T. 2013. Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature* 424: 516-523.
- Tesh, R.B., Peralta, P.H. y Johnson, K.M. 1969. Ecologic studies of vesicular stomatitis virus. I. Prevalence of infection among animals and humans living in an area of endemic VSV activity. *American Journal of Epidemiology* 90: 255–261.
- Toda, M., Rabkin, S., Kojima, H. y Martuza, R. 1999. Herpes simplex virus as an in situ cancer vaccine for the induction of specific anti-tumor immunity. *Hum. Gene Ther.* 10: 385-393.
- Todd, R. y Wong, D.T. 1999. Oncogenes. *Anticancer Research* 19: 4729–4746.

- Turner, P. E., y S. F. Elena. 2000. Cost of host radiation in an RNA virus. *Genetics* 156: 1465-1470.
- van der Noordaa J., F. Dekking, J. Posthuma, y B. J. Beunders. 1967. Primary vaccination with an attenuated strain of vaccinia virus. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 22: 210-214.
- Vandepol, S. B., Lefrancois, L. y Holland, J.J. 1986. Sequences of the major antibody binding epitopes of the indiana serotype of vesicular stomatitis virus. *Virology* 148: 312-325.
- Vignuzzi, M., Stone, J.K., Arnold, J.J., Cameron, C.E. y Andino, R. 2006. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* 439: 344-348.
- Walker, P., Firth, C., Widen, S., Blasdel, K., Guzman, H., Wood, T., Paradkar, P., Holmes, E., Tesh, R. y Vasilakis, N. 2015. Evolution of genome size and complexity in the rhabdoviridae. *PLoS Pathog.* 11: e1004664.
- Wallack, M.K., Sivanandham, M., Balch, C.M., Urist, M.M., Bland, K.I., Murray, D., Robinson, W.A., Flaherty, L., Richards, J.M., Bartolucci, A.A. y Rosen, L. 1998. Surgical adjuvant active specific immunotherapy for patients with stage iii melanoma: the final analysis of data from a phase III, randomized, double-blind, multicenter vaccinia melanoma oncolysate trial. *Journal of the American College of Surgeons* 187: 69-77.

Wang, W., Ji, W., Hu, H., Ma, J., Li, X., Mei, W., Xu, Y., Hu, H., Yan, Y., Song, Q., Li, Z. y Su, C. 2014. Survivin promoter-regulated oncolytic adenovirus with hsp70 gene exerts effective antitumor efficacy in gastric cancer immunotherapy. *Oncotarget* 5: 150–160.

Whelan, S. P., Ball, L.A., Barr, J.N. y Wertz, G.T. 1995. Efficient recovery of infectious vesicular stomatitis virus entirely from cDNA clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8388–8392.

Wimmer, E., Hellen, C.U. y Cao, X. 1993. Genetics of poliovirus. *Annual Review of Genetics* 27: 353–436.

Wollmann, G., Tattersall, P. y van den Pol, A.N. 2005. Targeting human glioblastoma cells : comparison of nine viruses with oncolytic potential. *J. Virol.* 79: 6005-6022.

Wu, B., Blanchard-Letort, A., Liu, Y., Zhou, G., Wang, X. y Elena, S.F. 2011. Dynamics of molecular evolution and phylogeography of barley yellow dwarf virus-PAV. *PloS One* 6: e16896.

Ylösmäki, E., Lavilla-Alonso, S., Jäämaa, S., Vähä-Koskela, M., af Hällström, T., Hemminki, A., Arola, J., Mäkisalo, H. y Saksela, K. 2013. MicroRNA-mediated suppression of oncolytic adenovirus replication in human liver. *PloS One* 8: e54506.

Yuste, E., Sánchez-Palomino, S., Casado, C., Domingo, E. y López-Galíndez, C. 1999. Drastic fitness loss in human immunodeficiency virus type 1 upon serial bottleneck events. *J. Virol.* 73: 2745-2751.

Zhou, X.L. y Tang, W.R. 2014. Advances in research on oncolytic adenoviruses in tumor therapy. *Bing Du Xue Bao* 30: 318-324.







# Anexo 1

## PCR VSV full genome in 4 fragments

### RT:

**Buffer 10x** 1  $\mu$ l

**Primer** 0.6  $\mu$ l

**dNTPs (10mM)** 1  $\mu$ l

**H2O** 4.4  $\mu$ l

**RNA** 2  $\mu$ l

5min 65°C → 5min RT → Add 1  $\mu$ l DTT + 1  $\mu$ l Accuscript RT → 25°C 10'

42°C 30'

70°C 15'

4°C  $\infty$

### PCR

**Buffer 5x** 5  $\mu$ l

**Primer FW** 0.5  $\mu$ l

**Primer Rev** 0.5  $\mu$ l

**dNTPs (10mM)** 0.5  $\mu$ l

**Phusion** 0.25  $\mu$ l

**DNA** 2  $\mu$ l

**H2O** 16.25  $\mu$ l

Thermociclador Conditions:

98°C 30"

98°C 10"

X°C 30" (1)

72°C X' (2)

35 CYCLES

72°C 10'

4°C  $\infty$

(1) F1 63°C/F2 58°C/F3 68°C/F4 68°C

(2) F1: 1min/F2,3,4: 2 min

Size F1: 3400pb // F2: 3093pb // F3: 3631pb // F4: 2424pb

## Anexo 2

### Real time PCR

#### Optimizing Primer Concentrations for PCR

The purpose of the procedure below is to determine the minimum primer concentrations giving the lowest threshold cycle (CT) and maximum  $\Delta R_n$  while minimizing nonspecific amplification. The reaction volumes are 50  $\mu\text{L}$ . Use 10 to 100 ng of genomic DNA or 1 to 10 ng of cDNA template.

- 1) Primer dilution at 2 $\mu\text{M}$
- 2) Prepare the plate with the next quantities of reagents per well
- 3) Seal the plate, spin and keep on ice before to introduce to the reader
- 4) Use the thermal cycling conditions in “Thermal Cycling Parameters for Primer Optimization”

At the end of the run:

- 5) Tabulate the results for the yield. This analysis identifies the optimum concentrations of primers for PCR yield.
- 6) Tabulate the results for the CT value. This analysis identifies the optimum primer concentrations for CT and for the absence of nonspecific amplification.
- 7) The dissociation curve must be only one peak

<b>Primers diluciones</b>						
WELL	PCR mix	Primer FW	Primer REV	cDNA	H2O	Total
B 1-2	20	1	1	2	16	40
B 3-4	20	1	6	2	11	40
B 5-6	20	1	9	2	8	40
B 7-8	20	6	1	2	11	40
B 9-10	20	6	6	2	6	40
B 11-12	20	6	9	2	3	40
C 1-2	20	9	1	2	8	40
C 3-4	20	9	6	2	3	40
C 5-6	20	9	9	2	0	40
C 7-8	20	1	1	0	18	40
C 9-10	20	1	6	0	13	40
C 11-12	20	1	9	0	10	40
D 1-2	20	6	1	0	13	40
D 3-4	20	6	6	0	8	40
D 5-6	20	6	9	0	5	40
D 7-8	20	9	1	0	10	40
D 9-10	20	9	6	0	5	40
D 11-12	20	9	9	0	2	40

## Standard curves

This step is not necessary if the quantification will be relative to an internal control, this is for absolute quantification.

- 1) Dilute the cDNA none/1:10/1:100/1:1000/1:10.000 (1-6)
- 2) Write the tubes for the primers
- 3) Prepare the MIX 1 for each pair of primers (well):

SYBER mix 10 $\mu$ l  
 Primer FW 1 $\mu$ l  
 Primer REV 1 $\mu$ l

- 4) Prepare the MIX 2 for each sample (x well):

cDNA 1 $\mu$ l  
 H2O 7 $\mu$ l



**Primers and concentrations for IFN-related Genes**

**INF-b FW** agcactggctggaatgagac (50nM) tm: 64.76

**INF-b Rev** tccttggccttcaggtaatg (300nM) tm: 62.28

**IFIT 1 FW** gcagaacggctgcctaattt (900 nM forward) tm: 63.54

**IFIT 1 Rev** TCAGGCATTTTCATCGTCATC (900 nM reverse) tm: 60.87

**Mx A fw** atggttgtttccgaagtggac (50nM)tm: 63.96

**Mx A rev** tttcttcagtttcagcaccag (300nM) tm: 61.53

**IRF7 FW** ctccccacgtataccatctac (50nM)tm: 64.30

**IRF7 REV** gatgtcgtcatagaggctgttg (300nM) tm: 63.58

**GAPDG FW** CATCTTCCAGGAGCGAGATC (300nM) tm: 62.51

**GAPDH REV** GTTCACACCCATGACGAACAT (300nM) tm: 64

## Anexo 3

### Image analysis for plaque area

Download the software Imaje J from google (It's free), there are two versions, is better to have the Fiji version which has more applications.

Is important to use a good resolution image, the color have to be homogenous and the number of the plaques must to be around 30 or less, with more than 30 most of the plaques will be so much close and is more difficult to automatized the process with good results.

The pictures can be made with the camera of the lab (Canon) and the tripod over one of the office spaces in the lab with the white light on. You will have the full plate, open the image with the Microsoft office picture manager and cut the image well by well (Edit image→ cut), save each image with the name. The resolution of the images will be around 1100x100 pixels.

### ANALYSIS

1. Start the Imaje J

2. Open the Image to analyze:

File→Open (Open the image two times, one is for analyze and the other one to help you with the visualization of the image)

3. Amplify the images:

Image→Zoom →In (+) (Only one time)

4. Adjust Brihtness/Contrast

Image→ Adjust→ Brihtness/Contrast



5. Adjust the threshold :

Image → Adjust → Threshold

This is manual, is important to be sure that all plaques are included (Here could to be problems if the image is not homogeneous).

6. Divide the plaques that are together

Process → Binary → Watershed

7. With the other image open check if there are more plaques to separate, in this case use the pencil tool that is in the task tools and separate one by one.

8. Select the area of the plate, to do this use the circle tool, cut the image and paste in a new file.

New file:

- Fill the background with black.
- Width and Height must to be the same that in the first picture
- Save with a name.
- Make the image binary

Process → Binary → Make binary

9. Set the parameters to analyze

Analyze → Set Measurements → Set parameters

**Select:** Area, display labels.

10. Analyze:

Analyze → Analyze particles

**Select:** Shape descriptors, clear results, summarize, add to manager, exclude on edges

Here we can check if there are outliers and eliminate by restriction of area. Check if the values correspond with plaques or there are some artifacts and exclude them by size. Close all the panels (ROI, results, summary,..) and measure again.

Save the results as xls.

## Anexo 4

### Concentration & purification of Vesicular Stomatitis virus

1. Infect ten 20 cm diameter culture dishes of Vero cells at MOI < 0.1. The cells should be  $\geq 80$  % confluent. Harvest the supernatant after 48 hours.
2. Purify the supernatant through a 0.2  $\mu\text{m}$  filter. Optional: the filter can get clogged - clarifying the supernatant by low-speed centrifugation (e.g. 2000 rpm, 5 min) before filtration helps.
3. Transfer to a 250 ml centrifuge bottle that fits rotor JA-14 (Beckman # 339247).
4. Spin at 14 000 rpm (30 100  $g_{av}$ ) for 1.5 hours at 4°C. Discard the supernatant and wash the pellet gently with PBS. Remove all traces of liquid.
5. Once all virus has been pelleted, let disperse overnight at 4°C in Solution C and additionally resuspend by aspiration. Proper resuspension is critical, otherwise you'll end up with multiple bands in your gradient. The total volume should not exceed 1.5 ml, if it does you may have to run the suspension on two gradients.
6. Prepare 15% and 35% OptiPrep solutions by diluting Solution D with Solution C. See below.
7. Prepare a 10.5 ml 15 – 35 % continuous OptiPrep gradient in a clear SW-41 Ti thin-walled ultracentrifuge tube (Beckman # 344059): transfer 5.5 ml 35% OptiPrep solution into the first chamber (the chamber closest to the exit valve) and 5 ml 15% OptiPrep solution into the second

chamber. Let ~0.5 ml of the 35% solution enter the tube before connecting the gradient chambers.

8. Carefully layer 1.5 ml virus suspension per gradient.
9. Spin at 36 000 rpm (160 000  $g_{av}$ ) for 1.5 hours at 4°C.
10. Collect the virus band (at least 600 ul) and aliquot. To avoid repeated freeze-thawing, make enough aliquots to last (e.g. sixty 10 ul aliquots). Store at -80°C.

### Recipes

The protocol is derived from OptiPrep Application Sheet V13 (Axis-Shield PoC AS., USA, <http://www.axis-shield-density-gradient-media.com/Applic/V13.pdf>).

#### Tris stock solution (100 mL)

Dissolve 12.1 g Tris base into 100 mL ddH<sub>2</sub>O. Filter and store at 4°C.

#### EDTA stock solution (100 mL)

Dissolve 3.72 g EDTANa<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O into 100 mL ddH<sub>2</sub>O. Filter and store at 4°C.

#### NaCl stock solution (100 mL)

Dissolve 5.84 g NaCl into 100 mL ddH<sub>2</sub>O. Filter and store at 4°C.

**Solution B (100 mL)**

To 50 ml water, add 30 mL Tris stock solution and 3.0 mL EDTA stock solution. Adjust pH to 7.4 with 5 M HCl, adjust volume to 100 mL with ddH<sub>2</sub>O. Filter and store at 4°C.

**Solution C (100 mL)**

To 50 ml water, add 10 mL NaCl stock solution, 5.0 mL Tris stock solution and 0.5 mL EDTA stock solution. Adjust pH to 7.4 with 1 M HCl, adjust volume to 100 mL with ddH<sub>2</sub>O. Filter and store at 4°C.

**Solution D**

5 volumes OptiPrep (Sigma, D1556-250ML)

1 volume Solution B

**Tabla S1.** Tamaño de calva de los mutantes en células no tumorales.

VIRUS	Tamaño calva (mm <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	
	MRC5	MEF
<b>WT</b>	29.5±0.7	16.3±0.5
<b>MΔ51</b>	10.3±0.3**	5.9±0.3**
<b>1978</b>	28.0±0.8	12.5±0.6**
<b>2151</b>	25.9±0.6*	15.3±0.9
<b>2401</b>	9.2±0.4*	6.8±0.5**
<b>2431</b>	25.5±0.7**	11.5±0.5**
<b>2607</b>	11.2±0.5**	10.1±0.4**
<b>2608</b>	12.0±0.5**	10.1±0.5**
<b>2686</b>	18.2±0.9**	12.2±0.7**
<b>2736</b>	24.9±0.9**	14.2±0.7
<b>2743</b>	23.2±0.6**	11.2±0.5**
<b>2936</b>	26.8±0.6	12.8±0.6**
<b>3351</b>	43.6±0.9**	17.1±0.7
<b>3460</b>	31.6±0.8	23.3±2.1**
<b>3846</b>	22.0±0.9**	13.0±0.5**
<b>8679</b>	20.6±2.3*	15.0±0.5
<b>11090</b>	26.3±0.7	13.6±0.6**

<sup>a</sup>Para cada virus se presenta la media del área en mm<sup>2</sup> de las 15-20 medidas tomadas ±SEM.

\*Se realizó un el test Shapiro-Wilks para evaluar la distribución de los datos y tras comprobar que no seguían una distribución normal se usó el test de Mann Whitney (corrección Dunn-sidak) para determinar la significatividad estadística con el virus wt (\*\* p <0.003, \* p<0.01).

**Tabla S2.** Tamaño de calva de los mutantes en células tumorales.

VIRUS	Tamaño calva (mm <sup>2</sup> )		
	MCF7	A549	4T1
<b>MΔ51</b>	6.5±0.31	3.8±0.1	8.3±0.4
<b>WT</b>	17.1±0.73**	9.6±0.6**	13.8±0.6**
<b>1978</b>	11.3±0.71**	5.4±0.2**	8.9±0.6
<b>2151</b>	10.9±0.63**	4.8±0.2**	11.2±0.4**
<b>2401</b>	6.1±0.4	4.2±0.2	8.9±0.5
<b>2431</b>	10.2±0.7**	5.4±0.3**	11.5±0.3**
<b>2607</b>	9.3±0.6**	5.55±0.3**	13.0±0.4**
<b>2608</b>	10.3±0.6**	5.8±0.3**	11.9±0.6**
<b>2686</b>	11.1±0.9**	5.8±0.2**	11.6±0.3**
<b>2736</b>	8.3±0.8	4.2±0.2	16.9±0.7**
<b>2743</b>	9.8±0.6**	5.3±0.3**	13.3±0.4**
<b>2936</b>	9.2±0.7*	5.8±0.3**	11.9±0.3**
<b>3351</b>	12.9±0.4**	8.7±0.4**	17.0±0.5**
<b>3460</b>	12.2±0.6**	6.0±0.4**	18.1±0.7**
<b>3846</b>	12.0±0.7**	6.7±0.4**	14.3±0.7**
<b>8679</b>	9.1±0.3**	5.3±0.2**	14.0±0.5**
<b>11090</b>	9.9±0.7**	4.6±0.2**	12.3±0.4**

\*Test de Mann Whitney (corrección Dunn-sidak), comparaciones con el virus MΔ51 (\*\* p <0.003, \* p<0.01)