



Universidad Nacional  
**SAN LUIS GONZAGA**



## **Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional**

Esta licencia es la más restrictiva de las seis licencias principales Creative Commons, permitiendo a otras solo descargar sus obras y compartirlas con otras siempre y cuando den crédito, pero no pueden cambiarlas de forma alguna ni usarlas de forma comercial.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>



## INFORME DE REVISIÓN

Se ha realizado el análisis con el software antiplagio de la Universidad Nacional "San Luis Gonzaga", por parte del Director de la Unidad de Investigación de la Facultad de Ciencias Biológicas, quien deja:

### CONSTANCIA

El que suscribe, deja constancia que se ha realizado el análisis con el software de verificación de similitud al documento cuyo título es:

#### **Potencial oncolítico del virus de la enfermedad de Newcastle en líneas celulares tumorales**

Presentado por:

**GLORIA ISABEL GUERRERO FONSECA**

Del nivel **PREGRADO** de la Facultad de **CIENCIAS BIOLÓGICAS** obteniéndose como resultado una coincidencia de **1%** otorgándosele el calificativo de:

**APROBADO**

Se adjunta al presenta el reporte de evaluación del software antiplagio.

Observaciones:

**SE APRUEBA EL PRESENTE TRABAJO POR TENER UNA SIMILITUD INFERIOR AL LIMITE ESTABLECIDO EN EL REGLAMENTO CORRESPONDIENTE (MENOR A 20%).**

Ica, 24 de Julio de 2023

FERNANDO PACHECO RAMOS  
DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN  
FAC. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
U.N. "SAN LUIS GONZAGA" ICA.

UNIVERSIDAD NACIONAL SAN LUIS GONZAGA  
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**Potencial oncolítico del virus de la enfermedad de Newcastle  
en líneas celulares tumorales**

Línea de investigación:

Salud pública y conservación del medio ambiente

**INFORME FINAL DE TESIS**

PRESENTADO POR:

Bach. GUERRERO FONSECA, GLORIA ISABEL

**ICA - PERÚ**

**2023**

## **DEDICATORIA**

A mis padres, Isabel y Luis por su apoyo constante e incondicional a lo largo de toda mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia, en especial a mis padres Luis William Guerrero e Isabel Fonseca, y a mi hermana Yoselyn, por ser mi fundamental pilar y haberme apoyado incondicionalmente en cada momento de mi vida.

A mis asesores, al Dr. Juan Carlos Tantaleán Vásquez por su orientación en la elaboración de este trabajo y sus orientaciones a lo largo de mi carrera universitaria y por haberme brindado el apoyo para desarrollarme profesionalmente. Al Dr. Manolo Fernández Díaz por permitir la realización de este proyecto en las instalaciones de la empresa Farmacológicos Veterinarios FARVET S.A.C. De manera especial a la Msc. Katherine Calderón Mayo y al Msc. Aldo Rojas Neyra quienes me guiaron con su experiencia y profesionalismo en la metodología, análisis de resultados y redacción de este trabajo de titulación.

A mis profesores de la universidad nacional San Luis Gonzaga que me compartieron sus conocimientos de manera profesional e invaluable, por su paciencia, su dedicación y sus orientaciones.

A mis compañeros Astrid Acevedo Poma, Freddy Ygnacio, Dora Rios Matos y Brigith Carbajal por su apoyo en la orientación práctica y la metodología de citometría de flujo.

A Farmacológicos Veterinarios FARVET S.A.C, que me brindó la oportunidad de desarrollar la presente investigación que fue Co-financiada por CONCYTEC-PROCIENCIA en el marco de la convocatoria de Proyectos de Investigación Básica y Aplicada E041-2017-02 (número de contrato 143-2017 Fondecyt).

## ÍNDICE

	Página
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE DE TABLAS	iii
INDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ESTRATEGIA METODOLÓGICA	7
2.1. Material biológico	7
2.1.1. Cultivos celulares	7
2.1.2. Huevos embrionados de pollo	7
2.1.3. Virus	7
2.1.4. Eritrocitos	8
2.1.5. Anticuerpos	8
2.2. Amplificación y títulos virales	8
2.2.1. Amplificación viral	8
2.2.2. Titulación de stocks virales	9
2.2.2.1. Ensayo de hemaglutinación (HA)	9
2.2.2.2. Titulación por ensayo en placa	9
2.2.2.3. Titulación por fluorescencia-ensayo en placa	11
2.3. Cinética de crecimiento de rLS1 y rLS1-XII-v2 sobre las líneas celulares DU 145, 786-O, y DF-1	12
2.4. Detección de la expresión de rLS1 y rLS1-XII-v2 sobre las líneas celulares DU 145 y 786-O por inmunofluorescencia indirecta.	13
2.5. Ensayo de selectividad replicativa de rLS1 y rLS1-XII-v2 sobre las líneas celulares DU 145, 786-O, y MDCK	14
2.6. Ensayo de citotoxicidad	15
2.7. Detección de apoptosis por doble marcaje ANEXINA-V/SYTOX por citometría de flujo	16
2.8. Análisis estadístico	17
III. RESULTADOS	18
3.1. Títulos virales	18
3.2. Características de replicación de los virus rLS1 y rLS1-XII-v2 sobre líneas celulares tumorales	18

3.3. Selectividad de replicación de los virus rLS1 y rLS1-XII-v2 entre células tumorales y no tumorales	29
3.4. Efecto citotóxico de los virus rLS1 y rLS1-XII-v2 sobre líneas celulares tumorales	31
3.5. Apoptosis inducida por los virus los virus rLS1 y rLS1-XII-v2 sobre líneas celulares tumorales	33
IV. DISCUSIÓN	36
V. CONCLUSIONES	40
VI. RECOMENDACIONES	41
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
VIII. ANEXOS	47



## ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Anticuerpos utilizados en el ensayo de inmunofluorescencia indirecta	8
Tabla 2	Títulos de los stocks virales: rLS1 y rLS1-XII-v2	18

## ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Cinética de replicación de los virus rLS1 y rLS1-XII-v2 sobre la línea celular tumoral DU 145.	20
Figura 2	Cinética de replicación de los virus rLS1 y rLS1-XII-v2 sobre la línea celular tumoral 786-O.	20
Figura 3	Cinética de replicación de los virus rLS1 y rLS1-XII-v2 sobre la línea celular DF-1.	20
Figura 4	Observación microscópica de la cinética de replicación del virus rLS1 sobre la línea celular tumoral DU 145.	21
Figura 5	Observación microscópica de la cinética de replicación del virus rLS1-XII-v2 sobre la línea celular tumoral DU 145.	22
Figura 6	Observación microscópica de la cinética de replicación del virus rLS1 sobre la línea celular tumoral 786-O.	23
Figura 7	Observación microscópica de la cinética de replicación del virus rLS1-XII-v2 sobre la línea celular tumoral 786-O.	24
Figura 8	Observación microscópica de la cinética de replicación del virus rLS1 sobre la línea celular DF-1.	25
Figura 9	Observación microscópica de la cinética de replicación del virus rLS1-XII-v2 sobre la línea celular DF-1.	26
Figura 10	Detección de la expresión de las proteínas de NDV sobre la línea celular tumoral DU 145 por inmunofluorescencia indirecta. 27	
Figura 11	Detección de la expresión de las proteínas de NDV sobre la línea celular tumoral 786-O por inmunofluorescencia indirecta.	28
Figura 12	Selectividad replicativa de rLS1 sobre las líneas celulares DU 145, 786-O y MDCK.	30
Figura 13	Selectividad replicativa rLS1-XII-v2 sobre las líneas celulares DU 145, 786-O y MDCK.	30

Figura 14	Citotoxicidad del virus rLS1 en células DU 145, 786-O y MDCK evaluada por ensayo MTS	31
Figura 15	Citotoxicidad del virus rLS1-XII-v2 en células DU 145, 786-O y MDCK evaluada por ensayo MTS.	32
Figura 16	Detección de apoptosis por doble marcaje ANEXINA V-PE/SYTOX en células DU 145 y 786-O infectadas con los virus rLS1 y rLS1-XII-v2	33
Figura 17	Análisis de cuadrantes de citometría de flujo de ANEXINA V-PE/SYTOX en la línea tumoral DU 145 infectada con los virus rLS1 y rLS1-XII-v2.	34
Figura 18	Análisis de cuadrantes de citometría de flujo de ANEXINA V-PE/SYTOX en la línea tumoral 786-O infectada con los virus rLS1 y rLS1-XII-v2.	35
Figura 19	Fotografía de placas de cultivo celular después de la incubación con el reactivo MTS para la determinación de citotoxicidad del virus rLS1 en células DU 145, 786-O y MDCK.	47
Figura 20	Fotografía de placas de cultivo celular después de la incubación con el reactivo MTS para la determinación de citotoxicidad del virus rLS1-XII-v2 en células DU 145, 786-O y MDCK.	47
Figura 21	Densidades ópticas de los experimentos realizados para la determinación de citotoxicidad del virus rLS1 en células DU 145, 786-O y MDCK por ensayo MTS.	48
Figura 22	Densidades ópticas de los experimentos realizados para la determinación de citotoxicidad del virus rLS1-XII-v2 en células DU 145, 786-O y MDCK por ensayo MTS.	49
Figura 23	Flujograma de ensayos realizados para la determinación del potencial oncolítico de los virus rLS1 y rLS1-XII-v2 sobre las líneas celulares DU 145, 786-O y MDCK.	50

## RESUMEN

La viroterapia se ha convertido en una opción terapéutica prometedora en el tratamiento del cáncer. El virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) causa una infección altamente contagiosa en aves y replica eficientemente sobre células tumorales. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad oncolítica de las cepas lentogénicas rLS1 y rLS1-XII-v2 sobre las líneas celulares de carcinoma prostático (DU 145) y cáncer renal (786-O), y evaluar su replicación selectiva en la línea celular no tumoral de riñón canino Madin-Darby (MDCK). El efecto citotóxico fue medido por el ensayo MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio). La selectividad replicativa fue evaluada por tinción con cristal violeta hasta la multiplicidad de infección (MOI) 20 y el porcentaje de apoptosis fue determinado con AnexinaV-PE/Sytox por citometría de flujo. El MTS determinó que rLS1 redujo la viabilidad de DU 145 y 786-O por debajo del 50% y 20% respectivamente, mientras que, rLS1-XII-v2 redujo la viabilidad de 786-O al 22% y de DU 145 a un 82%. Ambos virus no inhibieron la proliferación de las células MDCK, siendo selectivos hasta la MOI 20. Mediante el ensayo de AnexinaV-PE/Sytox se determinó que rLS1 indujo apoptosis significativamente (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ) sobre 786-O (49%) y DU-145 (38%), mientras que, rLS1-XII-v2 indujo un 25% de células apoptóticas en 786-O (\* $p < 0.05$ ) y 19% en DU 145, en comparación con células no infectadas. rLS1 presentó mayor actividad oncolítica por lo que podría convertirse en una alternativa terapéutica contra el cáncer de próstata y renal.

**Palabras clave:** Viroterapia, oncolítico, apoptosis, citotoxicidad.

## ABSTRAC

Virotherapy has become a promising therapeutic option in the treatment of cancer. Newcastle disease virus (NDV) causes a highly contagious infection in birds and replicates efficiently on tumor cells. The aim of this study was to evaluate the oncolytic activity of the lentogenic strains rLS1 and rLS1-XII-v2 in prostate carcinoma (DU 145) and renal cancer (786-O) cell lines, and their selective replication in the Madin-Darby non-canine kidney tumor cell line (MDCK). The cytotoxic effect was measured by MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) assay. Replicative selectivity was assessed by crystal violet staining up to Multiplicity of infection (MOI) 20 and percentage apoptosis was determined with AnnexinV-PE/Sytox by flow cytometry. The MTS assay determined that rLS1 reduced the cell viability of DU 145 and 786-O below 50% and 20%, respectively, while rLS1-XII-v2 reduced the viability of 786-O to 22% and 82% in DU 145. Both viruses did not induce a significant reduction in viability of MDCK cells and were selective up to MOI 20. In the AnnexinV-PE assay, rLS1 significantly induced apoptosis (\*\*\*\*P<0.0001) in 786-O (49%) and DU-145 (38%), while rLS1-XII-v2 induced 25% apoptotic cells in 786-O (\*p<0.05) and 19% in DU 145, compared to un-infected cells. rLS1 virus showed a higher oncolytic activity, so it could become therapeutic alternative against prostate and renal cancer.

**Keywords:** Virotherapy, oncolytic, apoptosis, cytotoxicity.

## I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se han desarrollado terapias novedosas contra el cáncer, debido a que es una de las principales causas de muerte a nivel mundial (1). En el 2020 se reportó casi 10 millones de muertes por cáncer en todo el mundo (2). En este mismo año, el Perú tuvo un total de 34 976 muertes por cáncer y 69 849 nuevos casos entre los que destacan: cáncer de próstata con 8 700, cáncer de mama con 6 860, cáncer gástrico con 6 300, cáncer colorrectal con 4 636 y cáncer de cuello uterino con 4 270 (3). El Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades del Ministerio de Salud (MINSA) reportó que cada año existe un diagnóstico de más de 66 000 casos nuevos de cáncer y se estima que 32 000 personas mueren por esta enfermedad (4).

El cáncer de próstata es el principal cáncer no cutáneo más común en hombres, presenta variaciones histopatológicas y genómicas muy heterogéneas (5), se encuentra clasificado en base a los siguientes tipos: adenocarcinomas, carcinomas de células pequeñas, tumores neuroendocrinos, carcinomas de células transicionales y sarcomas, siendo el adenocarcinoma el más común (6). El cáncer de próstata se inicia con una neoplasia intraepitelial prostática, seguida de una neoplasia prostática localizada, que posteriormente se convierte en adenocarcinoma de próstata en estado avanzado con invasión local, y culmina con un cáncer prostático metastásico, siendo principalmente los ganglios linfáticos el primer sitio de metástasis, seguido del hígado, pulmón y huesos (7).

De igual manera, el cáncer de riñón pertenece a un grupo heterogéneo de cánceres que tiene diversas alteraciones genéticas y moleculares relacionados a los muchos subtipos histológicos que presenta (8). Los tipos de cáncer renal son: carcinoma de células renales, carcinoma de células renales de tipo células claras, carcinoma de células renales de tipo células granulares (no claras). Entre los tipos menos frecuentes de cáncer de riñón se encuentran: el carcinoma de células renales del túbulo colector, carcinoma renal quístico multilocular, carcinoma medular, carcinoma renal mucinoso tubular y de células fusiformes, carcinoma renal asociado con neuroblastoma. Otros tipos de cáncer de riñón son: los carcinomas de células transicionales, los tumores de Wilms y los sarcomas renales (6). Las neoplasias metastásicas de riñón comprenden principalmente pulmones, huesos y cerebro, pero también se ha demostrado que las glándulas suprarrenales, el riñón contralateral y el hígado pueden verse afectados (9).

Existen diversos tratamientos contra el cáncer que dependen principalmente del tipo de cáncer y de la etapa de diagnóstico (10). Entre los tratamientos convencionales contra el cáncer de próstata y renal se encuentran la cirugía, quimioterapia, inhibidores de puntos de control inmunitarios, radioterapia, terapia con hormonas, inmunoterapia, etc. que en muchas ocasiones se usan en

combinación para incrementar la eficacia de la terapia y la supervivencia de los pacientes tratados (11–13) Cada uno de estos tratamientos presenta cuadros clínicos secundarios diferentes y tiene sus propias limitaciones (14,15).

A pesar del avance terapéutico, tanto el cáncer de próstata, como el cáncer de riñón siguen siendo un gran problema para la salud. En el 2020, en el Perú se reportó un total de 8 700 nuevos casos y 2 433 muertes a causa de cáncer de próstata, mientras que hubo un total de 2 030 nuevos casos y 810 muertes por cáncer renal (3). Por este motivo, continua la búsqueda de nuevas alternativas que sean menos invasivas, más eficientes, precisas, y que complementen o sustituyan las terapias convencionales (16).

La viroterapia se ha convertido en una herramienta altamente prometedora, ya que usa virus oncolíticos (VOs) de tipo naturales o diseñados genéticamente para destruir células tumorales (17). El mecanismo de acción de estos VOs se basa en la infección y su replicación sobre células cancerosas, lo que genera lisis celular. Muchos VOs tienen como característica una selectividad replicativa sobre células tumorales (18), esto se debe a que las células neoplásicas presentan alteraciones en la vía de señalización del interferón de tipo I, lo que genera que los virus oncolíticos tengan mayor replicación sobre ellas (19). Asimismo, cuando el virus ingresa a la célula cancerosa estimula una respuesta inmune innata y adaptativa en el microambiente del tumor (20), lo que implica que células como macrófagos, células asesinas naturales y linfocitos T citotóxicos se dirijan hacia el antígeno presente en las células tumorales infectadas lo que mejora la actividad antitumoral (21). Algunos estudios han determinado que el efecto oncolítico se relaciona con diversas vías apoptóticas de las células infectadas y a la expresión de proteínas involucradas al proceso apoptótico (22).

Con la ayuda de la ingeniería genética se están diseñando virus genéticamente modificados con el objetivo de incrementar su capacidad replicativa sobre células tumorales (23), así como la introducción de genes foráneos dentro del genoma vírico con la finalidad de incrementar su actividad oncolítica (24).

La mayoría de VOs seleccionados como agentes terapéuticos son cepas atenuadas o cepas que pueden replicarse en humanos sin generar enfermedades graves (18). Además, debido a la heterogeneidad y los diferentes tipos de cáncer que existen (5,25) un solo tipo de virus oncolítico no sería eficaz para destruir todas las células cancerosas, por lo que es importante evaluar el grado de eficiencia oncolítica de nuevas cepas viroterapéuticas que no generen cuadros clínicos graves y que sean seguras para el ambiente.

Diversas investigaciones proporcionan un mayor conocimiento sobre la actividad oncolítica de algunos virus no modificados y/o virus recombinantes modificados genéticamente utilizando ingeniería genética (17) Se han realizado ensayos experimentales *in vitro* e *in vivo* (26,27) para determinar su actividad sobre los diferentes tipos de cáncer.

El virus de la enfermedad de Newcastle (NDV, por sus siglas en inglés) es otro agente oncolítico que ha sido explorado desde los años 1965 (28,29) y en varios estudios e investigaciones se ha demostrado su capacidad de producir lisis en células de cáncer (30).

El NDV es un virus de ácido ribonucleico (ARN) de sentido negativo, no segmentado, que pertenece al género *Avulavirus*, a la subfamilia *Paramixovirinae* y a la familia *Paramixoviridae*. Pertenece al serotipo 1 de los paramixovirus aviares y tiene una envoltura pleomórfica alrededor de los 200 a 300 nm de diámetro (31). El genoma del NDV consta de seis genes que codifican proteínas estructurales denominadas: proteína de nucleocápside (NP), fosfoproteína (P), proteína matriz (M), proteína fusión (F), proteína hemaglutinina-neuraminidasa (HN), y la proteína de polimerasa (L) (32,33). Cinco de los seis genes del NDV codifican solo una proteína principal a excepción del gen P que codifica tres proteínas (P, V y W), cada gen esta flanqueado por secuencias de inicio y final, y entre ellas se encuentran secuencias intergénicas no codificantes (34).

El NDV ataca a las células uniéndose a compuestos que contienen ácido siálico a través del dominio de adhesión celular de la proteína HN (35) La acción de HN y F conduce a un cambio conformacional, lo que permite que la membrana del NDV se fusione con la célula huésped abriendo un poro para el ingreso del genoma viral en el citoplasma. El NDV también puede ingresar a las células mediante macropinocitosis o endocitosis (36). Después de entrar en el citoplasma de la célula huésped, el genoma de ARN de sentido negativo se transcribe en ARNm de sentido positivo que se traduce en proteínas virales. Las proteínas N, P, y L son esenciales en el ensamblaje de la nucleocápside (34)

El NDV es altamente infeccioso en aves y causa pérdidas a gran escala en el sector avícola. Según su grado de virulencia en estas especies el NDV se clasifica en: cepas lentogénicas (no virulentas), cepas mesogénicas (intermedias) y cepas velogénicas (virulentas) (37). Estas últimas cepas de NDV causan una mortalidad del 100% en aves de corral infectadas, por lo que se considera a la enfermedad de Newcastle como una de las dos enfermedades aviares más importantes en todo el mundo. Además de la clasificación según el grado de virulencia, las cepas de NDV también se clasifican en diferentes genotipos según la secuencia y el análisis filogenético del gen F (38,39).



Se ha determinado que en las cepas lentogénicas el sitio de clivaje es monobásico, y es clivado por proteasas como la tripsina que se encuentra en el tracto respiratorio y digestivo, por lo tanto, la replicación de estas cepas está restringido a tejidos específicos, por el contrario, las cepas velogénicas cuentan con un sitio de clivaje polibásico, el cual es clivado por proteasas como la furina que se encuentra en diversos tejidos. Diversos estudios han demostrado que el sitio de clivaje de la proteína F es el principal determinante de la patogenicidad y virulencia de NDV (40). Además, han determinado la estrecha relación entre la patogenicidad y virulencia de las cepas de NDV con sus propiedades oncolíticas, convirtiéndose así en una potencial promesa como agente terapéutico contra el cáncer (17).

Con base a la actividad de terapia antineoplásica, los NDV se clasifican en cepas líticas (mesogénicas y velogénicas) y no líticas (lentogénicas) (41). Las cepas líticas, en sus múltiples ciclos de replicación, pueden generar progenies con partículas virales infecciosas causando lisis en las células tumorales, mientras las cepas no líticas, tienen un solo ciclo de replicación y los viriones resultantes contienen variantes inactivas de la proteína F por lo que su efecto oncolítico está relacionado principalmente a la estimulación de la respuesta inmune (42).

Diversas investigaciones han demostrado la capacidad oncolítica del NDV: En un estudio reciente, se evaluó la capacidad inductiva de apoptosis y el efecto citotóxico de la cepa vacunal LaSota sobre la línea celular MCF-7, proveniente de adenocarcinoma de mama. En este estudio, se determinó los niveles de citotoxicidad, mediante el ensayo de bromuro de 3- [4,5-dimetiltiazol-2 il] 2,5-difeniltetrazolio (MTT), y la inducción de apoptosis, por citometría de flujo mediada por la tinción con anexina V/yoduro de propidio. Se determinó que la infección con NDV redujo la viabilidad y aumentó el porcentaje de células apoptóticas en la línea celular MCF-7, también se reportó que la cepa LaSota activó la vía intrínseca de la apoptosis (43).

De manera similar, se ha documentado la evaluación de la actividad oncolítica *in vitro* del NDV en cáncer de cuello uterino, infectando la línea celular tumoral de ratón TC-1, asociado al virus del papiloma humano (VPH) que expresan antígenos E6 / E7 del VPH 16, con la cepa LaSota del NDV, realizando los ensayos de MTT y lactato deshidrogenasa (DHL) para determinar la actividad antineoplásica. Además, mediante ensayos de anexina V/yoduro de propidio y western blot para evaluar la apoptosis temprana y el rol de las especies reactivas de oxígeno en células TC-1 infectadas con el NDV, demostraron una disminución de la viabilidad celular, la cual iba decreciendo en 54% y 43% con la multiplicidad de infección (MOI, por sus siglas en inglés) de 20 y 40, respectivamente, en comparación a las células no infectadas que se usaron como control. En la evaluación de la inducción de apoptosis se determinó que hubo una mayor actividad

oncolítica en las células TC-1 infectadas con una MOI de 20, proponiendo de esta manera al NDV como un candidato terapéutico contra el cáncer de cuello uterino (44).

Mediante la infección de las líneas celulares tumorales de carcinoma de pulmón (A549), glioblastoma (U87MG y T98G), adenocarcinoma de glándula mamaria (MCF7 y MDA-MB-453), carcinoma hepatocelular (Huh7), células renales embrionarias transformadas (HEK293), monocitos primarios, fibroblasto pulmonar (HF19), fibroblasto cutáneo (NB1RGB) y astroglia de rata (RCR-1) con la cepa LaSota con una MOI de 0.001 se determinó la actividad antineoplásica del NDV en diferentes líneas celulares tumorales. La citotoxicidad se evaluó utilizando el ensayo MTT. Los resultados indicaron que las líneas celulares tumorales A549, U87MG, T98G, Huh7, MDA-MB-453, y MCF7 tuvieron una viabilidad menor al 44%, mientras que las líneas celulares sanas HEK293, NB1RGB y RCR-1, una viabilidad del 84%, 73%, y 69% respectivamente (42).

Se ha evaluado el efecto antitumoral de la cepa LaSota del NDV recombinante que expresa la glicoproteína del virus de la rabia (rL-RVG), en la línea celular de adenocarcinoma de pulmón (A549). En el estudio, se realizó un ensayo de MTT para demostrar que la viabilidad de las células A549 disminuyó al incrementar la concentración viral. Los resultados mostraron que las tasas de inhibición de las células infectadas con rL-RVG fueron significativamente más altas que las células infectadas con la cepa de tipo salvaje. Además, se evaluó la inducción de apoptosis usando tinción doble de Anexina V/PI, el porcentaje de células A549 apoptóticas fue mayor en las células infectadas con rL-RVG a las 48h después de la infección (45).

En la evaluación del potencial oncolítico de la cepa LaSota del NDV que expresa la proteína fluorescente verde GFP (NDV-GFP) sobre cinco líneas celulares de carcinoma mamario canino (CMC): E20, E37, M5, M25 y CF41.Mg, y una línea celular no tumoral de fibroblastos embrionarios caninos, se determinó el efecto citotóxico comparando el IC50 (la concentración inhibitoria media máxima) para cada línea celular. Los resultados mostraron que todas las líneas celulares de CMC tuvieron mayor susceptibilidad a NDV-GFP en comparación con la línea celular no tumoral. Mediante la doble tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio se determinó que la causa de muerte inducida por NDV-GFP con IC50 para cada línea celular fue por apoptosis, proponiendo usar el NDV como una opción terapéutica contra el CMC (46).

Según la literatura revisada, no se ha documentado la evaluación del potencial oncolítico del NDV aislado en Perú (NDV/peacock/Perú/2011), con base a un análisis de filogenia mediado por el gen F pertenece al genotipo XII (47). Con la ayuda de la genética reversa se ha logrado diseñar un virus recombinante en base a LaSota (rLS1) (48), que lleva los ectodominios de los genes F y HN correspondientes al NDV genotipo XII (rLS1-XII-v2), cambiando el sitio de clivaje de polibásico a monobásico, convirtiéndose en una cepa segura para el ambiente (49) ya que en la actualidad

existen diversas limitaciones para utilizar cepas virulentas de NDV en personas, debido a que podría generar un posible rebrote al tener contacto con aves, causando daños al sector avícola (50).

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar la actividad oncolítica de las cepas rLS1 y rLS1-XII-v2, en inducir citotoxicidad y muerte celular por apoptosis, en dos líneas tumorales de origen humano (*Homo sapiens*): la línea celular tumoral DU 145, proveniente de una lesión metastásica en el cerebro de un hombre caucásico de 69 años de edad que fue diagnosticado con carcinoma prostática avanzada y metástasis generalizada (51), y la línea celular tumoral 786-O, que deriva de un carcinoma de células renales hipertriploide de un hombre de 58 años de edad (52, 53) utilizando los ensayos de MTS (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5- (3-carboximetoxifenil) -2- (4-sulfofenil) -2H-tetrazolio) y Anexina V-PE. Además, la efectividad oncolítica y su capacidad de replicación selectiva de ambas cepas fueron comparadas sobre las líneas tumorales y no tumoral normal, siendo este último una línea celular no tumoral de riñón canino Madin-Darby (MDCK) provienen de células epiteliales normales aisladas del túbulo renal de un perro adulto hembra de raza Cocker Spaniel (54).

## II. ESTRATEGIA METODOLÓGICA

### 2.1. Material biológico

#### 2.1.1. Cultivos celulares

Durante la realización de este trabajo de investigación se han empleado las siguientes líneas celulares:

- Células DF-1: Células de fibroblastos de pollo (ATCC).
- Células DU 145: Células de carcinoma prostático humano (ATCC).
- Células 786-O: Células de cáncer de riñón humano (ATCC).
- Células MDCK: Células de riñón canino Madin-Darby (ATCC).

El mantenimiento de todas las líneas celulares se realizó utilizando el medio Eagle modificado por Dulbecco F-12 (1:1) 1× (DMEM, por sus siglas en inglés) (catálogo No. SH30004.04, HyClone, USA), suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino inactivado por calor (SFB) (catálogo No. SH30066.03, Thermo Fisher Scientific, USA) y 1× de antibiótico-antimicótico-100× (Anti-Anti 1×), que contenía 10 000 unidades/ml de penicilina, 10 000 µg/ml de estreptomina y 25 µg/ml de anfotericina B (catálogo No. 15240062, Gibco, USA), fueron cultivadas a 37°C en atmósfera humidificada con 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub> (55).

#### 2.1.2. Huevos embrionados de pollo

Se emplearon huevos embrionados de pollo libres de patógenos específicos (SPF, por sus siglas en inglés) de 10 días de edad (Charles Rivers Avian Vaccine Services, USA). Los huevos SPF se mantuvieron en una incubadora a 37°C y entre 60-70% de humedad.

#### 2.1.3. Virus

Se utilizaron los siguientes virus, obtenidos y desarrollados anteriormente por el laboratorio de investigación 3 y 4 I+D de Farmacológicos Veterinarios (FARVET) (Chincha, Perú).

- rLS1: virus de la enfermedad de Newcastle clonado y obtenido previamente (48).

- rLS1-XII-v2: virus de la enfermedad de Newcastle recombinante que contiene los ectodominios de los genes F y HN correspondientes al genotipo XII, que fue obtenido previamente (49).

#### 2.1.4. Eritrocitos

Los eritrocitos de pollo fueron empleados en los ensayos de hemaglutinación (HA) para la detección y determinación del título de HA expresado en unidades hemaglutinantes (UHA) de NDV, los cuales fueron obtenidos de Charles Rivers Avian Vaccine Services.

#### 2.1.5. Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados durante este trabajo de investigación se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Anticuerpos utilizados en el ensayo de inmunofluorescencia indirecta

<b>Anticuerpos</b>	<b>Isotipo</b>	<b>Marca</b>	<b>Catálogo</b>
Anti-suero de Newcastle	IgY	Charles River	10100486
Goat Anti-Chicken IgY H&L (Alexa Fluor® 488) pAb	IgY	Abcam	ab150169

## 2.2. Amplificación y títulos virales

### 2.2.1. Amplificación viral

El stock viral fue realizado en huevos SPF de 10 días de edad. Un stock viral de 300 Unidades Formadoras de Placa (UFP) fueron inoculados en la cavidad alantoidea de huevos embrionados, e incubadas por 3-4 días a 37°C y 60-70% de humedad.

El fluido alantoideo fue recolectado y clarificado por centrifugación a una velocidad de 5000 gravedades (rcf), por 15 minutos a una temperatura de 4°C. Finalmente, el fluido alantoideo clarificado fue filtrado utilizando filtros de membrana de 0.22 µm (catálogo No. SLGP033RB, Merck, Alemania) y alicuotado en microtubos de 2ml (56).

Las alícuotas fueron conservadas en la ultracongeladora con una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso como stock viral.

## 2.2.2. Titulación de stock viral

### 2.2.2.1. Ensayo de hemaglutinación (HA)

Se agregó 25  $\mu\text{l}$  de PBS (0.1 M) en cada pocillo de una placa de microensayo de plástico con el fondo en V (Catálogo No. 701201, NEST, China). En el primer pocillo de la placa se agregó 25  $\mu\text{l}$  del virus rLS1. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas del virus en un volumen de 25  $\mu\text{l}$  las cuales fueron distribuidas en la placa. Se dejó el último pocillo sin infectar como control negativo del ensayo.

Se adicionó nuevamente 25  $\mu\text{l}$  de PBS a cada pocillo y finalmente se agregó 25  $\mu\text{l}$  de eritrocitos de pollo (Charles Rivers Avian Vaccine Services, USA) al 1% (v/v). Se mezcló la placa cuidadosamente y se dejó reposando durante 40 minutos a temperatura ambiente ( $20-22^{\circ}\text{C}$ ). Se realizó el mismo procedimiento para el virus rLS1-XII-v2.

Al finalizar el tiempo de incubación, se inclinó la placa y se observó la presencia o ausencia de aglutinación en forma de botón en el centro de la placa. El título del ensayo de HA fue determinado en base a la dilución más alta en la que se observó aglutinación completa y fue reportado como unidades hemaglutinantes UHA por mililitro (UHA/ml). Además, la dilución más alta en la que se observó aglutinación se consideró 1 UHA, y el número de UHA/0.025 ml se determinó con el inverso de la dilución.

El ensayo de hemaglutinación fue realizado según el manual de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, por sus siglas en inglés) sobre animales terrestres (57).

### 2.2.2.2. Titulación por ensayo en placa

Células DF-1 fueron subcultivadas en placas de cultivo celular de 12 pocillos (Catálogo No. 712001, NEST, China) con  $0.15 \times 10^6$  células/pocillo en un volumen de 1 ml de DMEM  $1\times$  suplementado con

5% de SFB, por 18-24 horas a 37 °C en condiciones atmosféricas que contenían 5 % de CO<sub>2</sub>.

El rLS1, se descongeló de forma gradual a temperatura ambiente (20-22 °C) Seguidamente, se realizaron diluciones seriadas agregando 225 µl de DMEM 1× (libre de SFB) en microtubos estériles de 1.5 ml. Se agregó 25 µl de la muestra viral, previamente homogenizada por vórtex al microtubo correspondiente a la primera dilución, el cual fue también homogenizado por vórtex. Se repitió el procedimiento sucesivamente hasta la dilución 10<sup>-7</sup>. En el microtubo correspondiente a la última dilución, se descartó 25 µl.

La confluencia de las células DF-1, previo al ensayo fue verificada y se rotuló cada pocillo de acuerdo con la dilución correspondiente. Se dejó un pocillo sin infectar como control negativo del procedimiento.

Se removió el medio de mantenimiento (1ml) de todos los pocillos por aspiración y se lavó cuidadosamente dos veces la monocapa con 500 µl de DPBS 1× (Catálogo No. D5773, Sigma-Aldrich, USA) inclinando suavemente la placa de un lado a otro. Luego el DPBS 1× fue removido y se procedió con la infección, agregando 200 µl del inóculo correspondiente a cada dilución/pocillo. Al pocillo destinado como control negativo del procedimiento sólo se le agregó 200 µl de DMEM 1× (libre de SFB), con la finalidad de mantener las mismas condiciones del experimento.

El inóculo se esparció sobre la monocapa inclinando suavemente la placa de un lado a otro y se dejó en incubación por 1 hora bajo condiciones de cultivo permitiendo así la adsorción del virus sobre las células DF-1. Para mantener la homogenización y evitar el secado de la monocapa se realizaron movimientos cada 15 minutos durante la hora de adsorción.

Antes de finalizar la hora de adsorción, se preparó el medio de recubrimiento conformado por: DMEM 2×+MgCl<sub>2</sub>, 2% de SFB, 5% de fluido alantoideo, Anti-Anti 1×, y agarosa 1%.

Finalizada la hora de adsorción se removió el inóculo de cada dilución sobre pocillo. Se lavó la monocapa con 500 µl de DPBS 1× para asegurar la eliminación de virus residual no internalizado. Se removió el DPBS 1×

y se agregó 1 ml del medio de recubrimiento a cada pocillo con una pipeta serológica. Se dejó reposar la placa a temperatura ambiente (20-22 °C) por 15 minutos sobre una superficie plana sin tocarla hasta la solidificación del agar, luego la placa fue incubada a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 5 días.

Finalmente, las placas fueron fijadas añadiendo 500 µl de formaldehído (Catálogo No. 1040032500, Merck, Alemania) al 4% a cada pocillo, se dejó reposar durante 8 horas a temperatura ambiente (20-22 °C).

Se removió la agarosa con un suave chorro de agua, seguidamente fueron teñidas agregando 500 µl de cristal violeta (Catálogo No. C0775, Sigma-Aldrich, USA) al 2% por pocillo y se dejó en reposo por 20 minutos a temperatura ambiente (20-22 °C). Se lavó con chorro suave de agua inclinando la placa y se dejó secar por 1 hora (48). El título viral fue definido por el factor de dilución que contenía entre 10 a 70 placas, expresado en unidades formadoras de placa UFP por mililitro (UFP/ml). Este experimento se realizó por duplicado.

Se aplicó la siguiente fórmula para determinar el título viral:

$$\text{Título viral (UFP/ml)} = \frac{\text{Número de placas}}{\text{Dilución empleada} \times \text{Volumen añadido}}$$

#### 2.2.2.3. Titulación por fluorescencia-ensayo en placa

Para el rLS1-XII-v2, se realizó el ensayo en placa como se ha descrito anteriormente en el apartado 2.2.2.2. Seguidamente de la fijación con formaldehído al 4% por 8 horas, se realizó el ensayo de inmunofluorescencia indirecta. Se realizaron 3 lavados sucesivos con DPBS 1× a cada pocillo de la placa por 5 minutos en movimientos de inclinación.

Se agregó 250 µL de Triton X-100 (catálogo No. 648463, Merck, Alemania) al 0.1% en DPBS 1× frío a todos los pocillos y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente (20-22 °C) en movimientos de



inclinación. Se lavó 3 veces la monocapa con DPBS 1× frío por 5 minutos en movimientos de inclinación.

Se agregó 150 µl del anticuerpo primario: anti-suero de Newcastle (No. de referencia 10100486, Charles River Avian Vaccine Services, USA) en una dilución 1:200, diluido en Albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) (catálogo No. A7030-500G, Sigma-Aldrich, USA) al 5% en DPBS 1× y se dejó incubar por 1 hora a temperatura ambiente (20-22 °C) en movimiento de inclinación.

Concluida la hora de incubación se removió el anticuerpo primario y se lavó 3 veces la monocapa con DPBS 1× frío por 5 minutos en movimientos de inclinación. Se removió el DPBS 1× y seguidamente se agregó 150 µl del anticuerpo secundario: Goat Anti-Chicken IgY H&L Alexa Fluor® 488 (catálogo No. Ab150169, Abcam, USA) en una dilución 1:1000, diluido en BSA al 5% en DPBS 1×, la placa fue cubierta con papel aluminio para brindar condiciones de oscuridad y se dejó en incubación por 1 hora a temperatura ambiente (20-22 °C) con movimientos de inclinación. Se removió el anticuerpo secundario y se lavó 4 veces la monocapa con DPBS 1× frío por 10 minutos en oscuridad con movimiento de inclinación.

Los movimientos de inclinación de todo el procedimiento fueron realizados utilizando el equipo de agitación Rocker (VWR, USA)

La fluorescencia fue visualizada utilizando el microscopio invertido con fluorescencia (Carl Zeiss, Alemania) y la Unidad de control Colibri.2 (Carl Zeiss, Alemania), cada foco fluorescente fue considerado y contado. El título viral fue reportado como UFP/ml.

Los títulos de ambos stocks virales (almacenados a -80°C) fueron utilizados en los posteriores ensayos de manera independiente.

### 2.3. Cinética de crecimiento de rLS1 y rLS1-XII-v2 sobre las líneas celulares DU 145, 786-O, y DF-1

Se sembró una placa de cultivo celular de 12 pocillos (Catálogo No. 712001, NEST, China) para cada línea celular con una concentración de  $0.15 \times 10^6$  células por pocillo para las líneas celulares DU 145 y DF-1, y  $0.12 \times 10^6$  células por pocillo de la línea

celular 786-O en un volumen de 1 ml de DMEM 1× suplementado con 5% de SFB y se dejó en incubación por 18-24 horas a una temperatura de 37 °C y condiciones atmosféricas que contenían 5 % de CO<sub>2</sub>.

Se utilizó DMEM 1× suplementado con 2% de SFB y 5% de fluido alantoideo como medio de infección en volumen de 1ml por pocillo. Se infectaron los pocillos con ambos virus: rLS1 y rLS1-XII-v2, con una multiplicidad de infección (MOI, por sus siglas en inglés) de 0.1 para las líneas celulares tumorales DU 145 y 786-O y una MOI de 0.05 para la línea celular DF-1, dejando dos pocillos sin infectar como controles negativos del experimento. Las placas se dejaron en incubación en condiciones de cultivo.

Seguidamente, se recolectó el sobrenadante de los pocillos por aspiración a las 12, 24, 36, 48, 60, 72, y 84 horas post-infección (hpi), el sobrenadante fue conservado a -20°C para su titulación.

Finalmente, se cuantificó el título viral realizando un ensayo en placa de cada sobrenadante recolectado siguiendo el procedimiento mencionado con anterioridad en el apartado 2.2.2.2. para rLS1 y 2.2.2.3. para rLS1-XII-v2, respectivamente.

Para la observación de la replicación de ambos virus sobre las líneas celulares infectadas, se capturaron fotografías de cada hora evaluada utilizando un microscopio en campo claro (Carl Zeiss, Alemania), con un aumento de 100X, estas imágenes fueron representadas con la barra de escala de 100 µm.

Este ensayo fue realizado por triplicado en experimentos independientes.

#### 2.4. Detección de la expresión de rLS1 y rLS1-XII-v2 sobre las líneas celulares DU 145 y 786-O por inmunofluorescencia indirecta.

Se sembraron 3 placas de 24 pocillos (Catálogo No. 702001, NEST, China) con  $0.1 \times 10^6$  y  $0.08 \times 10^6$  células por pocillo de la línea celular DU 145 y 786-O respectivamente, con un volumen de 500 µl/pocillo de DMEM 1× suplementado con 5% de SFB. Después 18-24 horas de incubación a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> se removió el medio de mantenimiento y se lavó la monocapa con DBPS 1×.

Se infectaron los pocillos con la Multiplicidad de infección (MOI, por sus siglas en inglés) de 0.01 de rLS1 y rLS1-XII-v2. Se dejaron pocillos sin infectar como

controles negativos. Las placas fueron fijadas a las 12, 24, y 48 horas post-infección con formaldehído al 4% por 30 minutos. La expresión del NDV fue detectada mediante el ensayo de inmunofluorescencia indirecta descrito anteriormente en el apartado 2.2.2.3.

Finalmente, los núcleos celulares fueron identificados por tinción con DAPI (Catálogo No. ab104139, Abcam, USA) y se tomaron fotografías en campo fluorescente de la infección viral con un aumento de 100X y utilizando dos canales (365 y 470 nm) en el microscopio invertido con fluorescencia (Carl Zeiss, Alemania) y la Unidad de control Colibri.2 (Carl Zeiss, Alemania). Todas las fotografías fueron representadas con una barra de escala de 100  $\mu\text{m}$ .

## 2.5. Ensayo de selectividad replicativa de rLS1 y rLS1-XII-v2 sobre las líneas celulares DU 145, 786-O y MDCK

Células DU 145, 786-O y MDCK fueron subcultivadas en placas de cultivo celular de 96 pocillos (Catálogo No. 701001, NEST, China) con una concentración de  $1 \times 10^4$ ,  $0.8 \times 10^4$ , y  $0.5 \times 10^4$  células por pocillo respectivamente, en un volumen de 200  $\mu\text{l}$ /pocillo de DMEM  $1\times$  suplementado con 5% de SFB, a 37 °C con una atmosfera humidificada con 5 % de  $\text{CO}_2$  por 18-24 horas.

Posteriormente, se removió el medio de mantenimiento de los pocillos y se lavó la monocapa con DPBS  $1\times$  para remover restos celulares, se procedió con la infección agregando 200  $\mu\text{l}$  del medio de infección sobre cada pocillo en las tres líneas celulares con diferentes MOIs (0.01, 0.1, 1, 10, y 20) de rLS1 y rLS1-XII-v2. Se dejaron pocillos sin infectar como controles negativos del procedimiento.

A las 48 hpi, se removió el medio de infección de todos los pocillos, se realizaron 3 lavados con DPBS  $1\times$  para remover virus no internalizados, las placas fueron fijadas con 100  $\mu\text{l}$ /pocillo de formaldehído al 4% por 15 minutos a temperatura ambiente (20-22 °C). Luego, se removió el formaldehído y se realizaron 3 lavados con DPBS  $1\times$ . Finalmente, las placas fueron teñidas agregando 100  $\mu\text{l}$  de cristal violeta al 2% por 10 minutos a temperatura ambiente (20-22 °C). Los lavados, la fijación y tinción de las placas se realizaron en movimientos de agitación utilizando el equipo Rocker. (VWR, USA).

Se determinó la selectividad de replicación de los virus rLS1 y rLS1-XII-v2 mediante la capacidad de adherencia de las células viables en el fondo del pocillo que fue

evaluada a las 48 hpi y detectada por tinción con cristal violeta. Se observó macroscópicamente la ausencia y/o reducción de tinción en los pocillos infectados y se comparó con los pocillos no infectados usados como control negativo del ensayo.

Este ensayo fue realizado por triplicado en experimentos independientes.

## 2.6. Ensayo de citotoxicidad

Células DU 145, 786-O, y MDCK fueron subcultivadas en placas de cultivo celular de 96 (Catálogo No. 701001, NEST, China) pocillos con una concentración de  $1 \times 10^4$ ,  $0.8 \times 10^4$  y  $0.5 \times 10^4$  células por pocillo respectivamente, en DMEM  $1 \times$  suplementado con 5% de SFB e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  y 5 % de  $\text{CO}_2$ .

Seguidamente el sobrenadante fue removido, la monocapa fue lavada con DPBS  $1 \times$  para eliminar los restos celulares, y fue reemplazado con el medio de infección agregando 200  $\mu\text{l}$ /pocillo. Todas las células fueron infectadas con las MOIs 0.1, 1, y 10 de los virus rLS1 y rLS1-XII-v2. Se dejaron pocillos sin infectar como controles negativos del procedimiento.

Una vez transcurridas 48 hpi, 20  $\mu\text{l}$  del reactivo MTS (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5- (3-carboximetoxifenil) -2- (4-sulfofenil) -2H-tetrazolio) (Catálogo No. ab197010, Abcam, USA) fueron añadidos en cada pocillo, las placas fueron incubadas por 4 horas en condiciones de cultivo a  $37^\circ\text{C}$  y una atmósfera de 5 % de  $\text{CO}_2$ , en oscuridad (Figura 19 y 20). Seguidamente se procedió a leer la absorbancia de las muestras de cada pocillo a una longitud de onda de 490 (OD 490 nm) utilizando el equipo de lector de placas (BioTeck, USA) (Figura 21 y 22).

El porcentaje de viabilidad se determinó en función al promedio calculado de la absorbancia de todos los pocillos del control negativo de cada línea celular con respecto al promedio calculado de la absorbancia de todos los pocillos infectados con cada una de las MOIs, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de viabilidad celular} = \frac{\text{Promedio de la absorbancia de pocillos infectados}}{\text{Promedio de la absorbancia del control negativo}} \times 100\%$$

## 2.7. Detección de apoptosis por doble marcaje ANEXINA-V-PE/SYTOX por citometría de flujo

La capacidad de los virus rLS1 y rLS1-XII-v2 de inducir muerte celular programada “apoptosis” sobre las líneas celulares tumorales DU 145 y 786-O, fue determinada siguiendo las instrucciones de la Anexina V-PE (Catálogo No. ab14154, Abcam, USA) para la detección de apoptosis temprana y el marcaje de SYTOX (Catálogo No. S34857, Invitrogen, USA) + Anexina V para la detección de apoptosis tardía.

Se prepararon frascos de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> (Catálogo No. 708003, NEST, China) con una concentración de  $2.3 \times 10^6$  células para la línea celular tumoral DU 145 y  $1.4 \times 10^6$  células para la línea celular tumoral 786-O con un volumen de 15 ml de DMEM 1× suplementado con 5% de SFB, los frascos de cultivo celular se dejaron en incubación por 18-24 horas a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>.

Se removió el medio de cada frasco de cultivo celular y se lavó la monocapa con DPBS 1×, se agregó 15 ml del medio de infección a cada frasco y se infectaron las líneas celulares con una MOI de 1 de los virus rLS1 y rLS1-XII-v2. Se dejaron los frascos sin infectar como controles negativos del experimento y se mantuvieron en condiciones de cultivo.

A las 48 hpi, se eliminó el sobrenadante de cada frasco celular y se agregó 1.5 ml de tripsina + EDTA 0.25% (Catálogo No. SH30042.02, HyClone, USA) sobre la monocapa para desprender las células en adherencia, los frascos de cultivo se dejaron en incubación a 37°C por 3 minutos aproximadamente y se agregó 10 ml de DMEM 1× suplementado con 10% SFB para neutralizar la tripsina y EDTA. Las células recolectadas y el sobrenadante se centrifugaron a 500 rcf por 5 minutos a 4°C.

Se decantó el sobrenadante, y el pellet celular fue resuspendido con DPBS 1×, se consideraron células resuspendidas en el sobrenadante + células que se encontraban en adherencia, se realizó el conteo celular correspondiente a cada frasco de cultivo. Se colocó  $1 \times 10^6$  células de cada frasco de cultivo en un tubo cónico de 15 ml de capacidad y se centrifugó a 500 rcf por 5 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se eliminó el exceso de DPBS 1× con una punta estéril, el pellet celular fue resuspendido con 1 ml del buffer Anexina V-PE 1× + HEPES (Catálogo No. 15630-106, Gibco, USA) 0.1M pH 7.2, y se colocó 400 µl de la resuspensión en tubos de citometría.

Para detectar la apoptosis temprana y tardía se agregó 1 µl del reactivo Anexina V-PE sobre la resuspensión celular por 15 minutos de incubación a temperatura ambiente (20-22 °C) y en oscuridad. Seguidamente, como marcador celular de viabilidad, se agregó 0.5 µl del reactivo Sytox (Catálogo No. S34857, Invitrogen, USA) por 5 minutos de incubación a temperatura ambiente (20-22 °C) en oscuridad.

Se analizaron los tubos por el haz de luz láser del citómetro de flujo (BD FACSCanto™ II, USA) usando el canal PE de color azul para Anexina V-PE, con líneas de excitación (Ex. de 488 nm) y emisión (Em. 530 nm) y el canal V450 de color violeta para el colorante Sytox con Ex. 444 nm y Em. 480 nm distinguiendo 4 poblaciones: las células viables (AnexinaV-/Sytox-), células apoptóticas tempranas (Anexina V+), células apoptóticas tardías (Anexina V+/Sytox+) y células necróticas (Sytox+). El porcentaje total de células apoptóticas se calculó en base a la población de células apoptóticas tempranas más células apoptóticas tardías (% de células apop. = células apop. temprana + células apop. tardías). Este ensayo se realizó por triplicado en experimentos independientes.

Todos los experimentos realizados se muestran en la figura 23.

## 2.8. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism v8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA.). Las diferencias en los grupos se compararon mediante la prueba ANOVA unidireccional seguido de la prueba de comparaciones múltiples Tukey. Los títulos obtenidos en las cinéticas de replicación de los virus sobre las líneas celulares fueron analizados mediante ANOVA bidireccional con pruebas de comparación múltiple. Las diferencias se consideraron significativas en \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  y \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

### III. RESULTADOS

#### 3.1. Títulos virales

Los títulos de los stocks virales; rLS1 y rLS1-XII-v2 obtenidos por ensayo de hemaglutinación (HA) fueron 512 y 256 unidades hemaglutinantes por ml (UHA/ml), respectivamente.

El título viral de rLS1 fue de 2.90E+08 unidades formadoras de placa por ml (UFP/ml) y de rLS1-XII-v2 fue de 1.25E+07 UFP/ml cuantificado por ensayo en placa en la línea celular DF-1 (Tabla 2).

**Tabla 2.** Títulos de los stocks virales: rLS1 y rLS1-XII-v2.

Stocks virales	UHA/ml <sup>(a)</sup>	UFP/ml <sup>(b)</sup>
rLS1	512	2.90E+08
rLS1-XII-v2	256	1.25E+07

(a) Unidades hemaglutinantes por mililitro (UHA/ml) fueron evaluadas por ensayo de hemaglutinación.

(b) Unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/ml) fueron cuantificadas mediante ensayo en placa.

#### 3.2. Características de replicación de los virus rLS1 y rLS1-XII-v2 sobre líneas celulares tumorales

Los títulos de los sobrenadantes recolectados en células DU 145 infectadas con el virus rLS1 fueron 7.50E+03, 9.67E+03, 1.13E+04, 1.42E+04, 8.33E+03, 6.67E+03, y 4.33E+03 UFP/ml a las 12, 24, 36, 48, 60, 72, y 84 horas post-infección (hpi) respectivamente. Mientras que, con el virus rLS1-XII-v2 se obtuvieron títulos de 5.67E+01, 7.00E+01, 1.00E+02, 1.80E+02, 1.73E+02, 1.57E+02, y 5.83E+01 UFP/ml a las 12, 24, 36, 48, 60, 72, y 84 hpi respectivamente. Además, el virus rLS1 mostró títulos significativamente más altos que rLS1-XII-v2 a las 12, 24, 36, 48, y 60 hpi ( $****p < 0.0001$ ), a las 72 hpi ( $***p < 0.001$ ) y a las 84 hpi ( $*p < 0.05$ ) (Figura 1).

En las células 786-O infectadas con el virus rLS1, los títulos fueron 1.00E+04, 2.02E+04, 6.33E+04, 1.97E+05, 2.37E+04, 2.08E+04, y 1.58E+04 UFP/ml a las 12,

24, 36, 48, 60, 72, y 84 hpi respectivamente. Con el virus rLS1-XII-v2 se obtuvieron títulos de  $8.33E+02$ ,  $1.02E+03$ ,  $1.15E+03$ ,  $1.55E+03$ ,  $7.33E+02$ ,  $6.17E+02$ , y  $7.83E+01$  UFP/ml. En esta línea celular, el virus rLS1 mostró títulos significativamente más altos que rLS1-XII-v2 a las 36 hpi ( $*p < 0.05$ ) y 48 hpi ( $****p < 0.0001$ ), y no hubo diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre los títulos de ambos virus a las 12, 24, 60, 72, y 84 hpi (Figura 2).

En la línea celular DF-1 infectada con el virus rLS1, los títulos obtenidos fueron  $6.13E+03$ ,  $1.19E+05$ ,  $2.13E+05$ ,  $9.07E+05$ ,  $2.07E+05$ ,  $1.90E+05$ , y  $2.02E+05$  UFP/ml. Mientras que, con el virus rLS1-XII-v2 fueron  $3.50E+01$ ,  $7.67E+01$ ,  $2.32E+03$ ,  $2.50E+03$ ,  $1.22E+03$ ,  $8.83E+02$ , y  $8.00E+02$  UFP/ml a las 12, 24, 36, 48, 60, 72, y 84 hpi respectivamente. Además, solo hubo diferencia significativa entre los títulos virales a las 48 hpi ( $****p < 0.0001$ ) y no se encontró diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre los títulos de ambos virus en las demás horas evaluadas (Figura 3).

El virus rLS1 mostró títulos más altos que rLS1-XII-v2 sobre las tres líneas celulares hasta las 84 hpi. Los virus rLS1-XII-v2 y rLS1 alcanzaron un título viral más alto a las 48 hpi en la línea celular DF-1 con aproximadamente  $2.50E+03$  UFP/ml y  $9.07E+05$  UFP/ml respectivamente (Figura 3). Los resultados muestran que tanto el virus rLS1, como rLS1-XII-v2 se replican satisfactoriamente sobre las líneas celulares tumorales y células DF-1, pero la replicación del virus rLS1-XII-v2 fue lenta y alcanzó títulos más bajos que el virus rLS1.

Los virus no mostraron características de crecimiento similares. El virus rLS1 mostró una mayor propagación en las líneas celulares tumorales en comparación al virus rLS1-XII-v2, observado por microscopía en campo claro a las 12, 24, 36, 48, 60, 72, y 84 hpi (Figura 4, 6, y 8). El virus rLS1-XII-v2 presentó una propagación más restringida en comparación al virus rLS1 (Figura 5, 7, y 9). No se observó un efecto citopático (ECP) claro o formación de sincitios con lisis celular, mientras que rLS1 presentó ECP típico del virus de la enfermedad de Newcastle en la línea celular DF-1 (Figura 8).



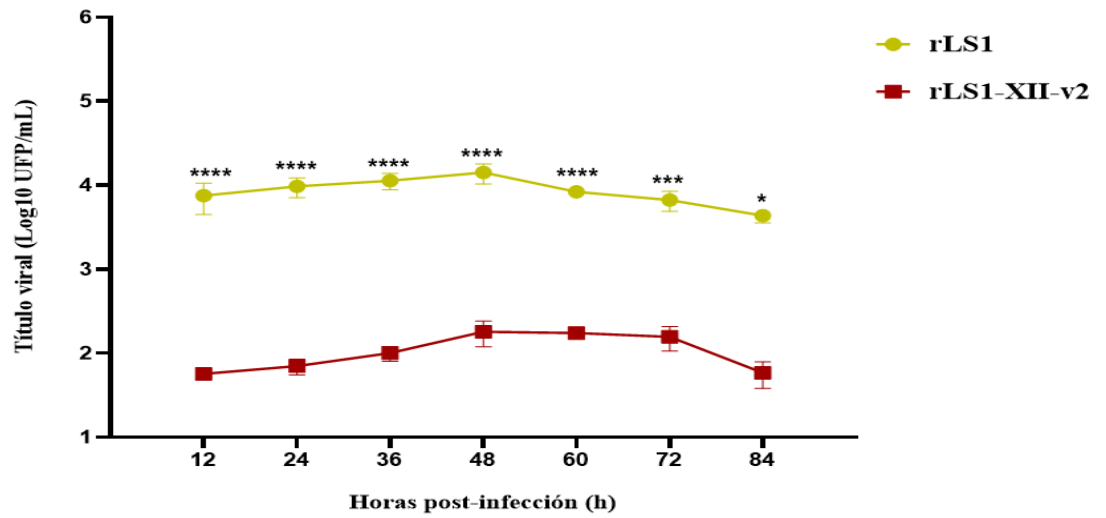


Figura 1. Cinética de replicación de los virus rLS1 y rLS1-XII-v2 sobre la línea celular tumoral DU 145.

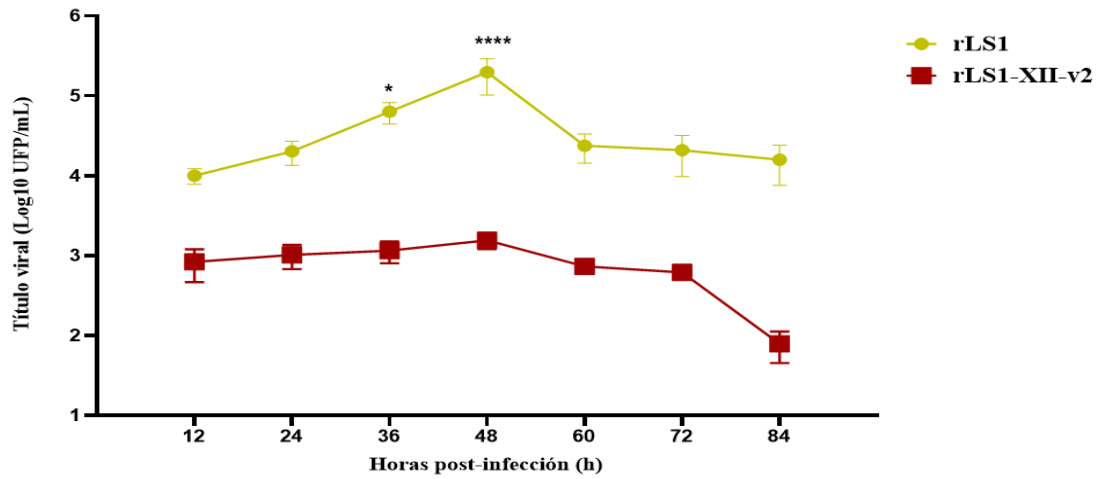


Figura 2. Cinética de replicación de los virus rLS1 y rLS1-XII-v2 sobre la línea celular tumoral 786-O.

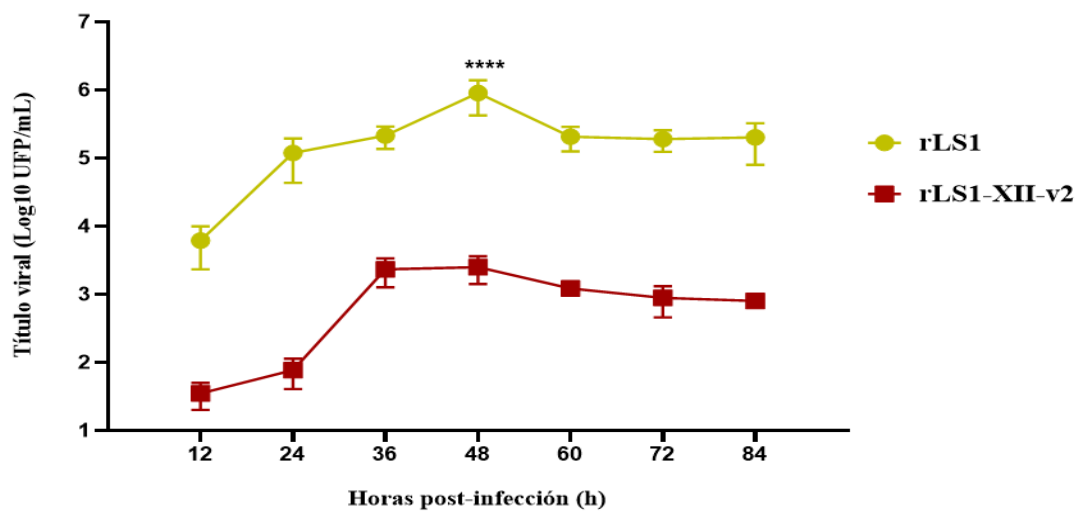


Figura 3. Cinética de replicación de los virus rLS1 y rLS1-XII-v2 sobre la línea celular DF-1.

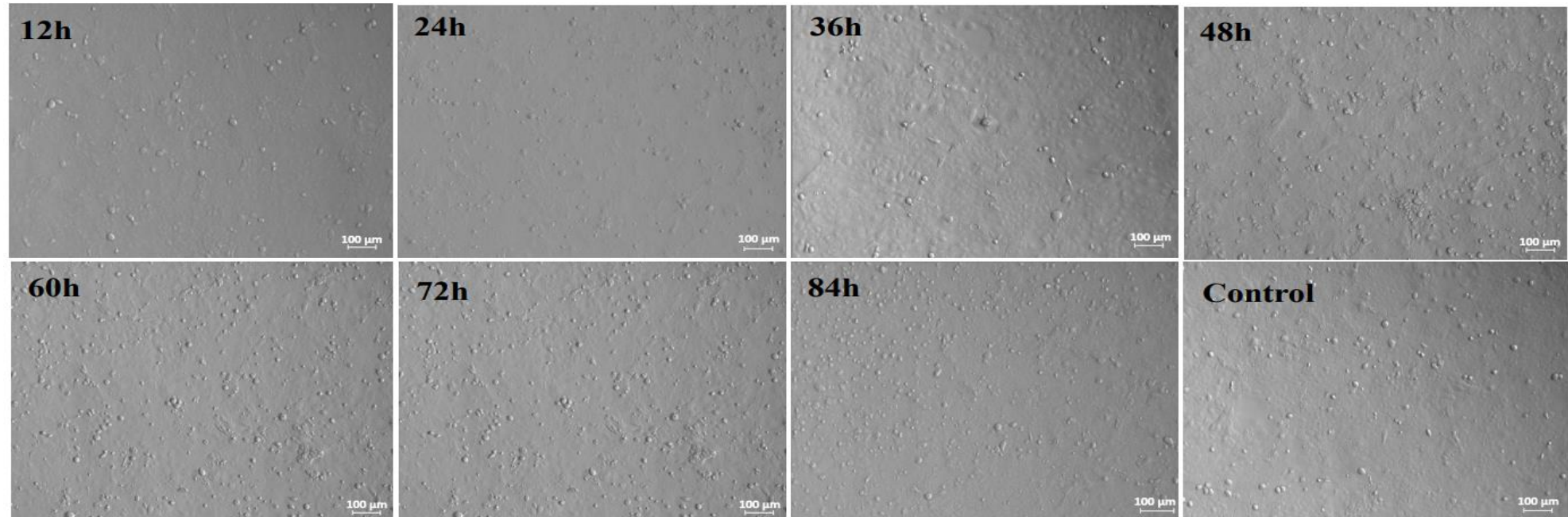


Figura 4. Observación microscópica de la cinética de replicación del virus rLS1 sobre la línea celular tumoral DU 145 (100X).

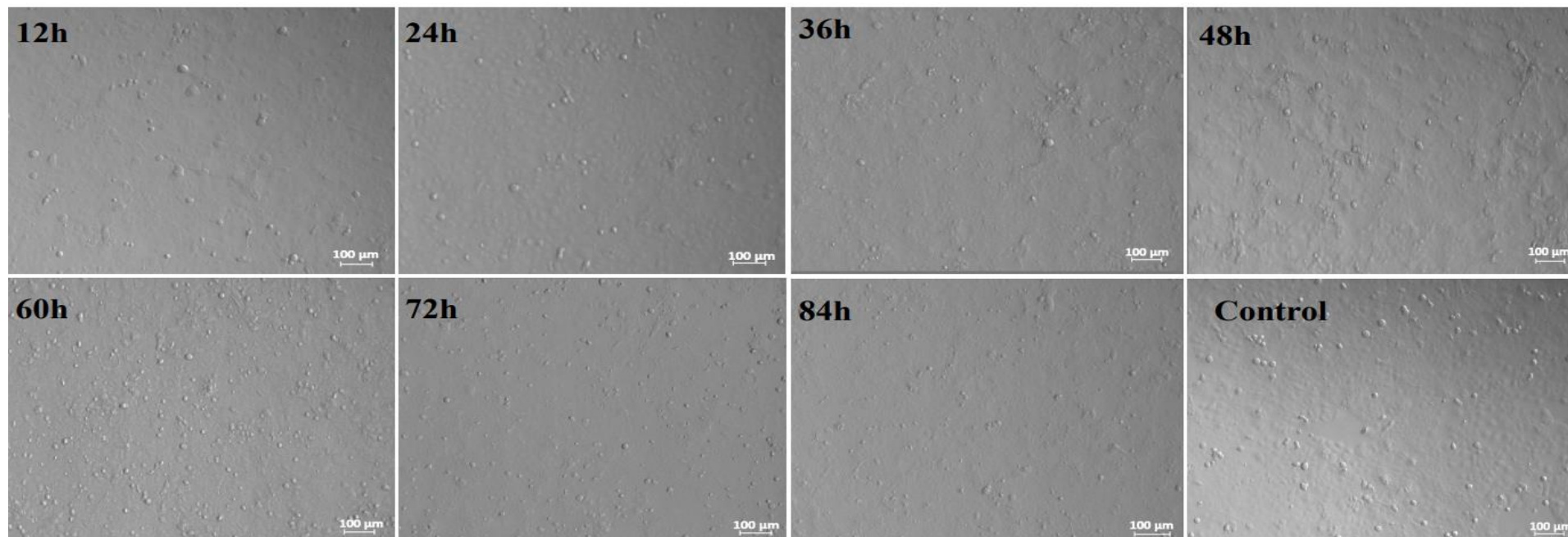


Figura 5. Observación microscópica de la cinética de replicación del virus rLS1-XII-v2 sobre la línea celular tumoral DU 145 (100X).

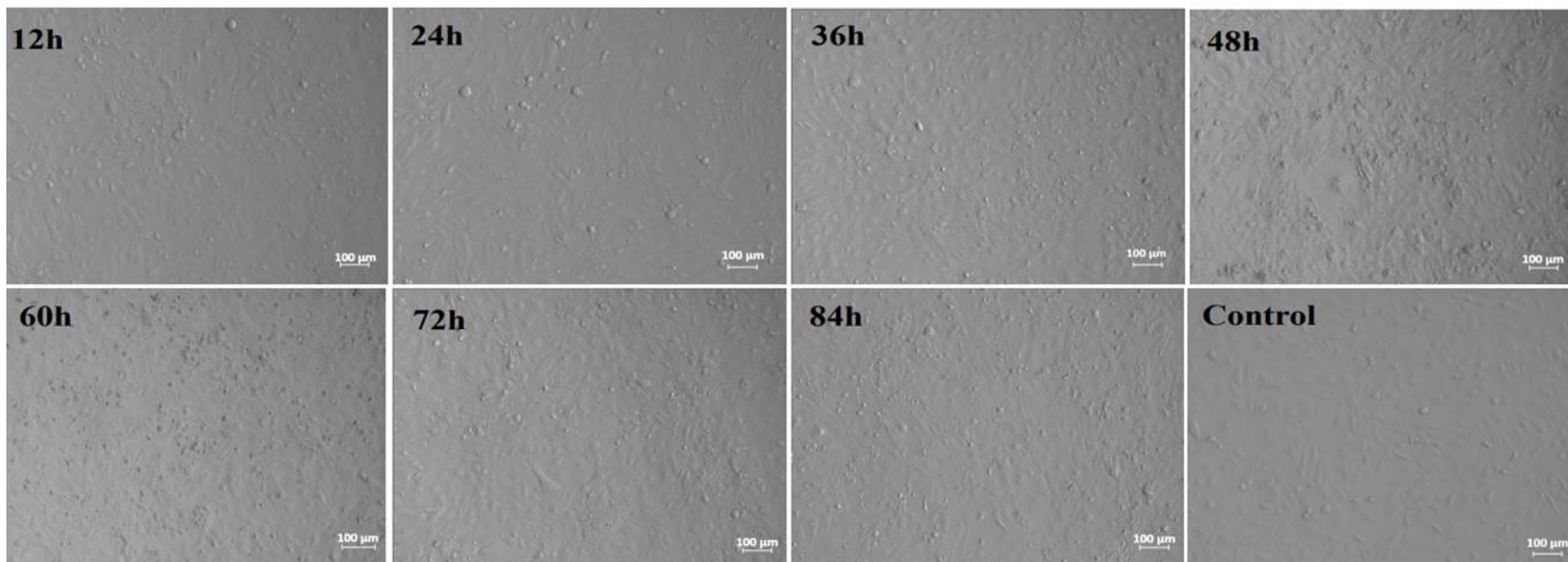


Figura 6. Observación microscópica de la cinética de replicación del virus rLS1 sobre la línea celular tumoral 786-O (100X).

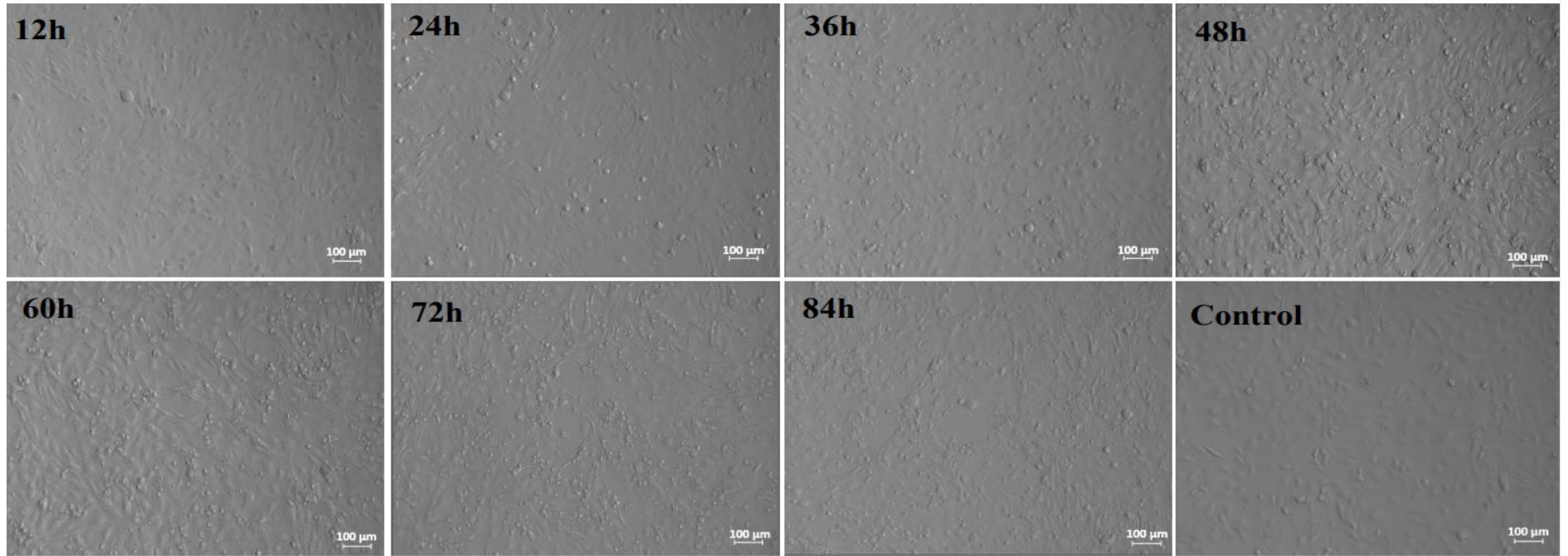


Figura 7. Observación microscópica de la cinética de replicación del virus rLS1-XII-v2 sobre la línea celular tumoral 786-O (100X).

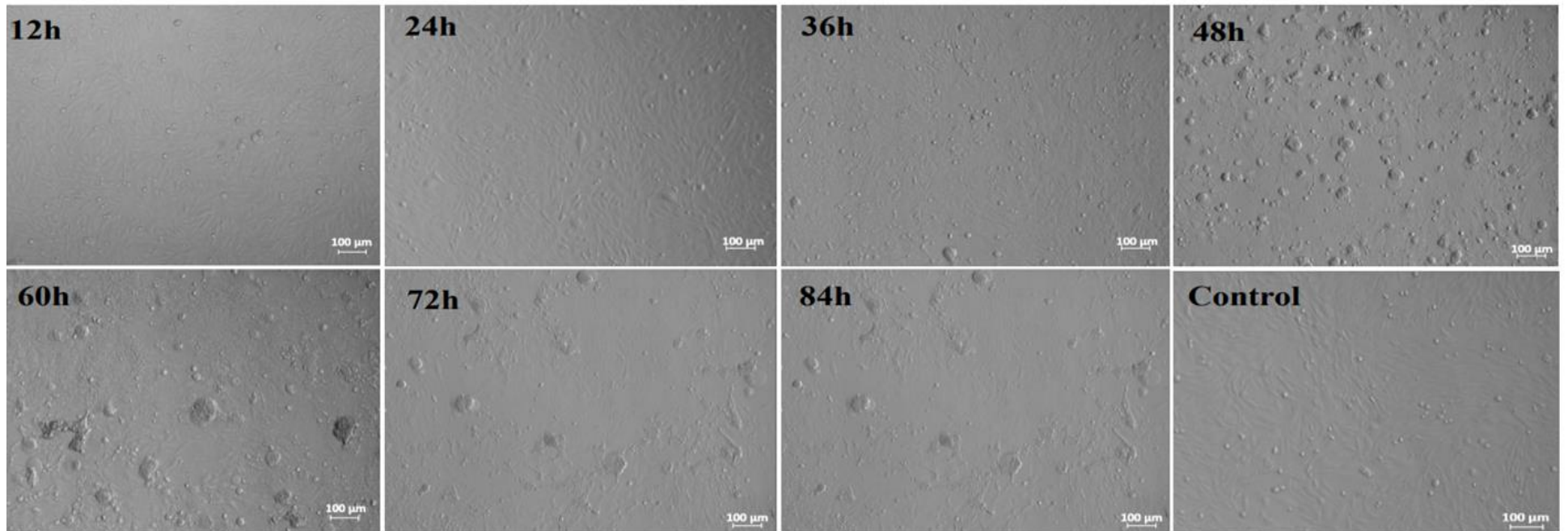


Figura 8. Observación microscópica de la cinética de replicación del virus rLS1 sobre la línea celular DF-1 (100X).

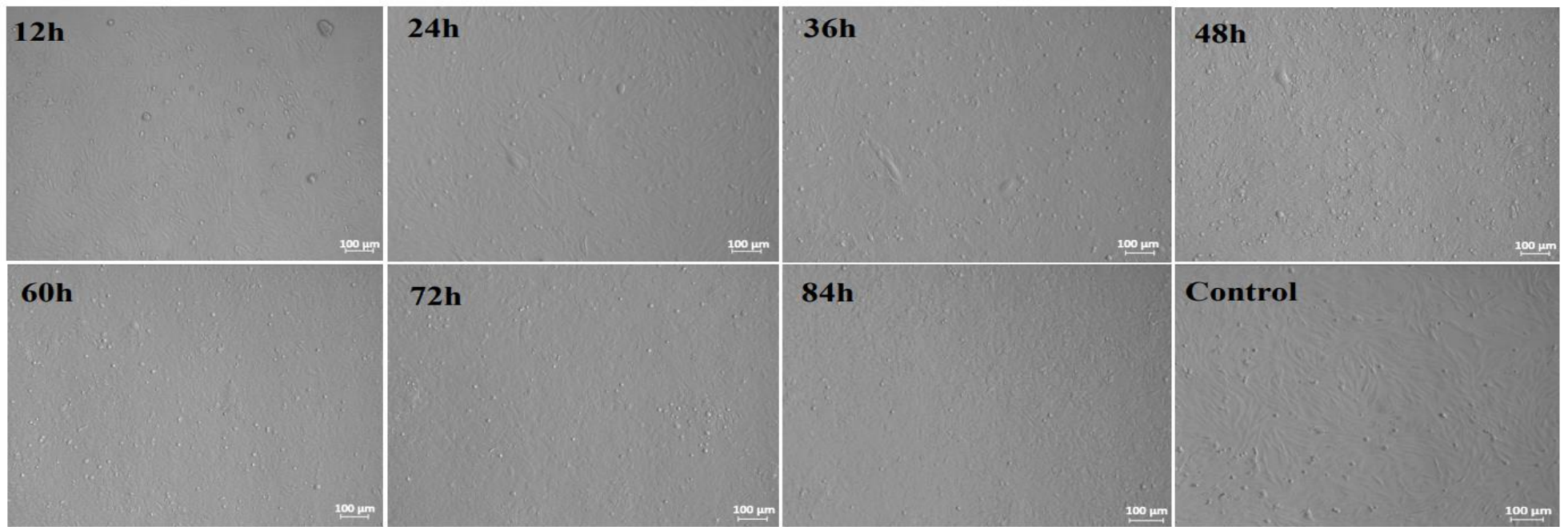


Figura 9. Observación microscópica de la cinética de replicación del virus rLS1-XII-v2 sobre la línea celular DF-1 (100X).

Las células tumorales DU 145 y 786-O infectadas con los virus rLS1 y rLS1-XII-v2 reaccionaron positivamente al anticuerpo específico contra NDV, detectando su expresión mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta, lo que confirma la replicación de ambos virus en las células tumorales infectadas (Figura 10 y 11).

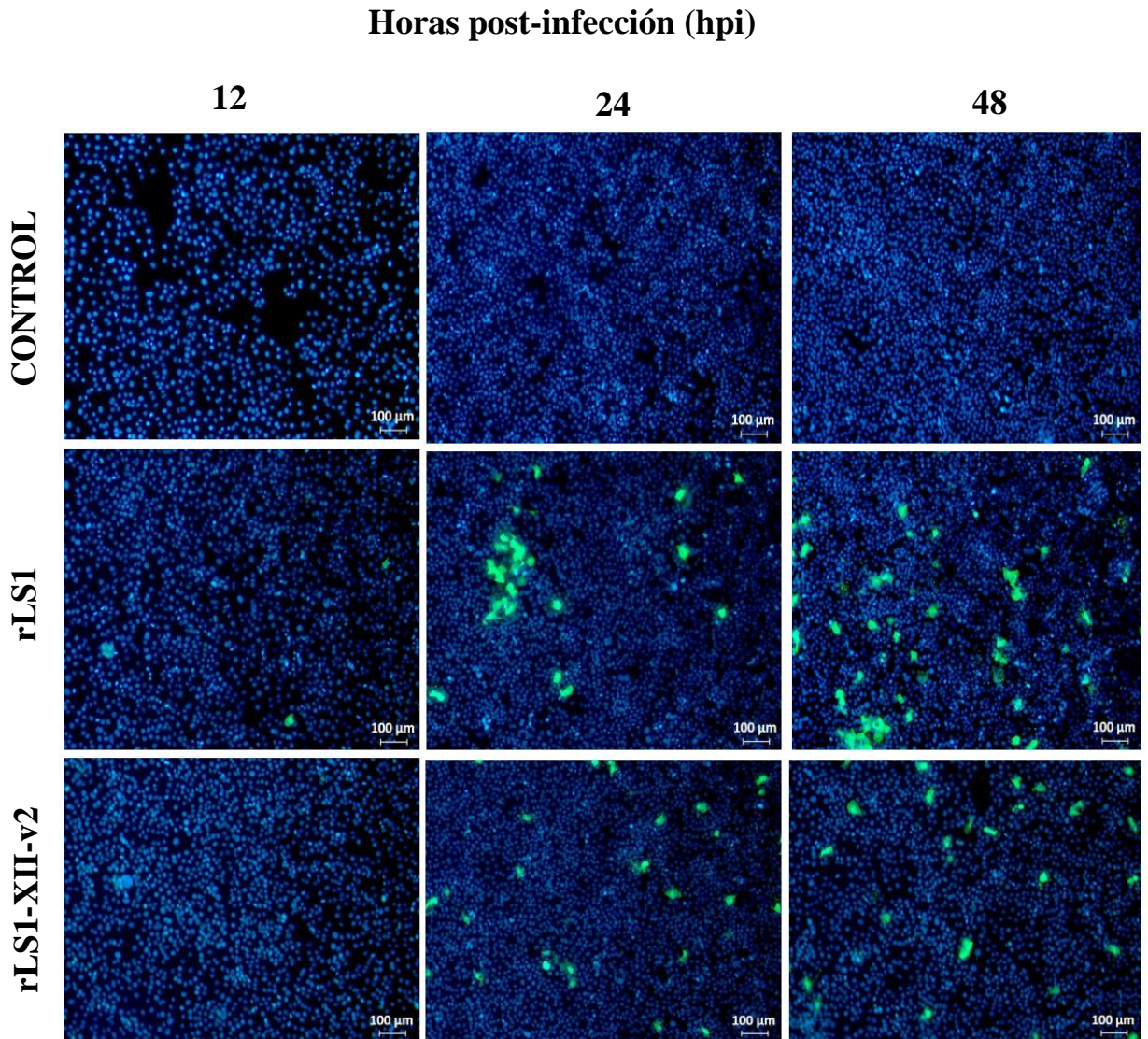


Figura 10. Detección de la expresión de las proteínas de NDV sobre la línea celular tumoral DU 145 por inmunofluorescencia indirecta (100X).



Horas post-infección (hpi)

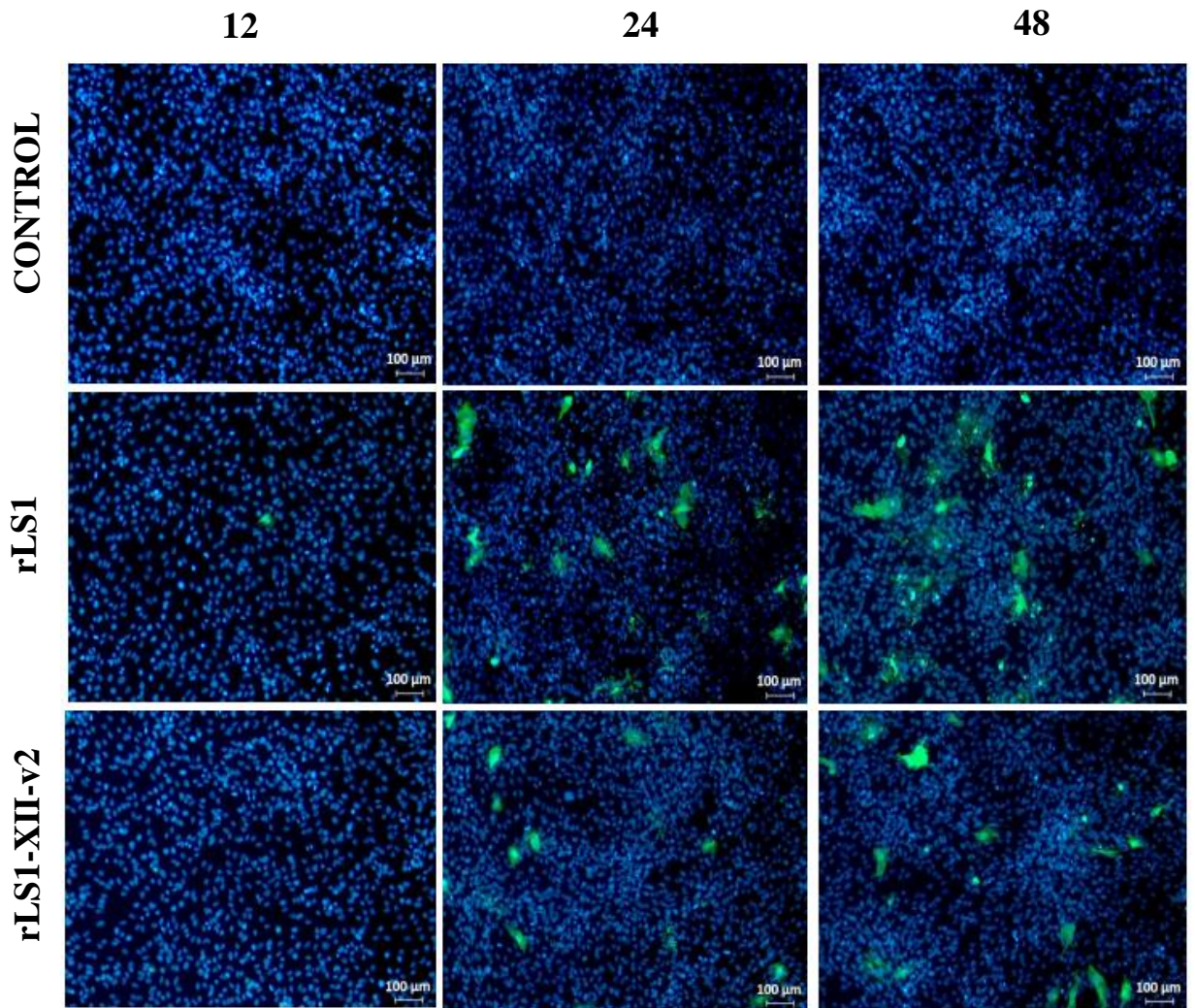


Figura 11. Detección de la expresión de las proteínas de NDV sobre la línea celular tumoral 786-O por inmunofluorescencia indirecta (100X).

### 3.3. Selectividad de replicación de los virus rLS1 y rLS1-XII-v2 entre células tumorales y no tumorales

Se observó disminución de viabilidad celular en las líneas tumorales DU 145 y 786-O infectadas con el virus rLS1 a partir de la MOI 1 mediante la ausencia completa de la tinción en el fondo de los pocillos. En las células 786-O hubo una disminución de la viabilidad celular a partir de la MOI 0.1, donde se observó la ausencia parcial de la tinción violeta. En la línea celular MDCK no se observó ausencia de tinción violeta en ninguno de los pocillos infectados con las diferentes MOIs (Figura 12).

El virus rLS1-XII-v2, redujo la viabilidad de la línea tumoral 786-O a partir de la MOI 0.1 mediante la ausencia completa de tinción violeta en el fondo de los pocillos tratados. Por otro lado, se observó por microscopía un efecto citopático ligero (ECP-L) sobre la línea celular DU 145, sin embargo, no mostró ausencia de tinción violeta lo cual podría indicar que no hubo una reducción completa de la viabilidad en los pocillos tratados. Por el contrario, en la línea celular no tumoral MDCK, se observó una tinción violeta completa sobre los pocillos tratados a excepción de las células tratadas con la MOI 20 que mostró una disminución parcial (Figura 13).

De esta manera, se confirmó que los virus rLS1 y rLS1-XII-v2 son seguros, debido a que causaron efectos citotóxicos y disminución de viabilidad limitado sobre la línea celular no tumoral MDCK en comparación con las células tumorales DU 145 y 786-O, demostrando así, su replicación selectiva.

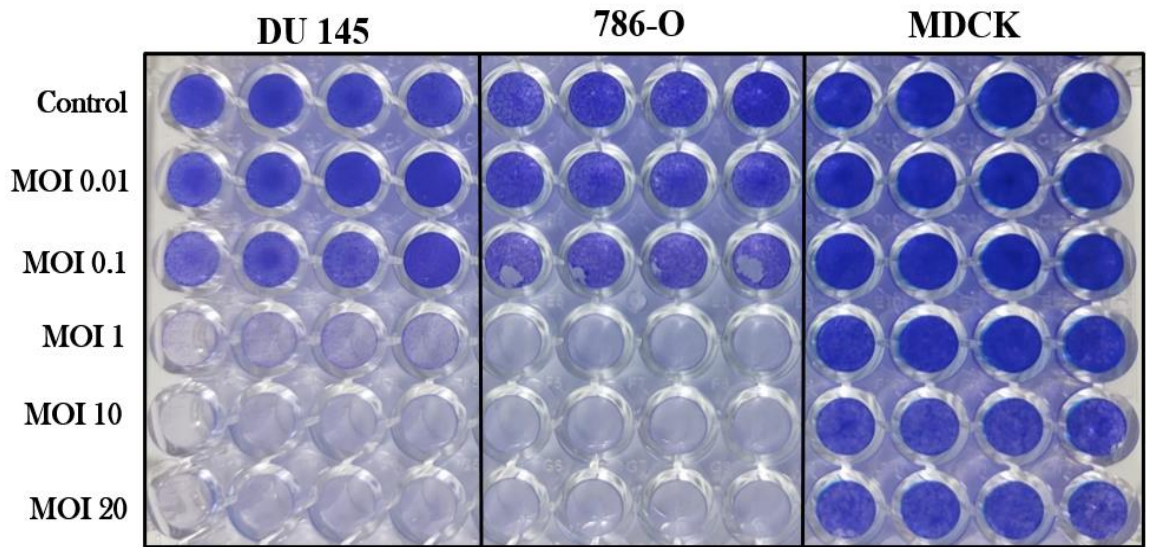


Figura 12. Selectividad replicativa del virus rLS1 sobre las líneas celulares DU 145, 786-O, y MDCK.

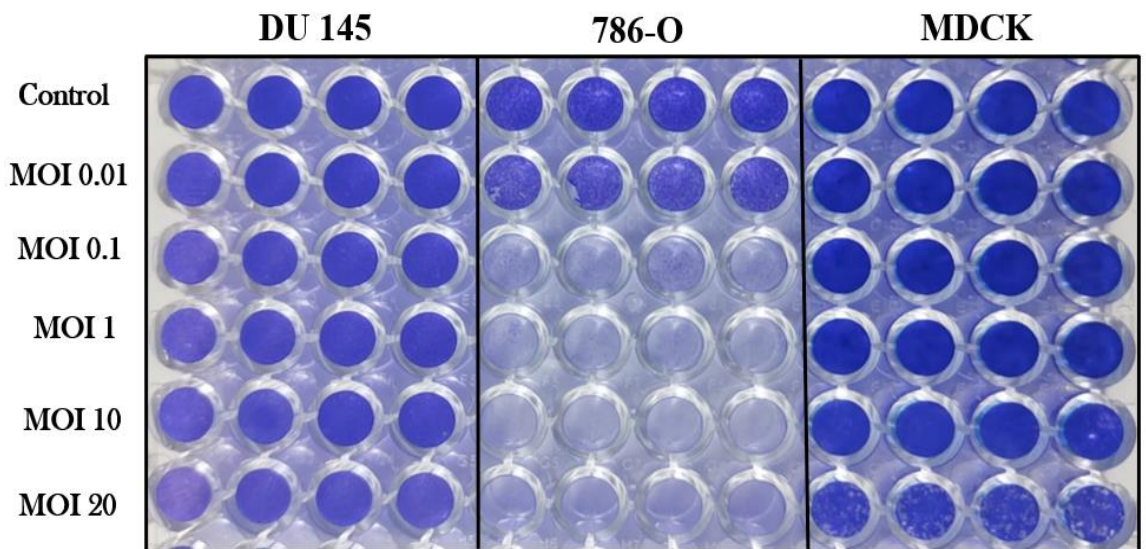


Figura 13. Selectividad replicativa del virus rLS1-XII-v2 sobre las líneas celulares DU 145, 786-O, y MDCK.

### 3.4. Efecto citotóxico de los virus rLS1 y rLS1-XII-v2 sobre líneas celulares tumorales

El virus rLS1, redujo significativamente la viabilidad de las células DU 145 y 786-O de manera dependiente de la MOI. Los resultados mostraron (Figura 14) que la viabilidad de las células DU 145 se redujo significativamente al 45.32% y 31.20% con las MOIs de 1 y 10 respectivamente (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ), mientras que con la MOI de 0.1 hubo una reducción del 87.85%. La viabilidad de las células 786-O se redujo significativamente al 79.50% con una MOI 0.1 (\*\* $p < 0.01$ ), mientras que con MOIs de 1 y 10 la viabilidad celular se redujo al 17.66% y 13.96% respectivamente (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ). En la línea celular MDCK no hubo una disminución significativa de la viabilidad celular con 92.71%, 89.62% y 87.72% a las 48hpi ( $p > 0.05$ ). Los valores son expresados como la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes.

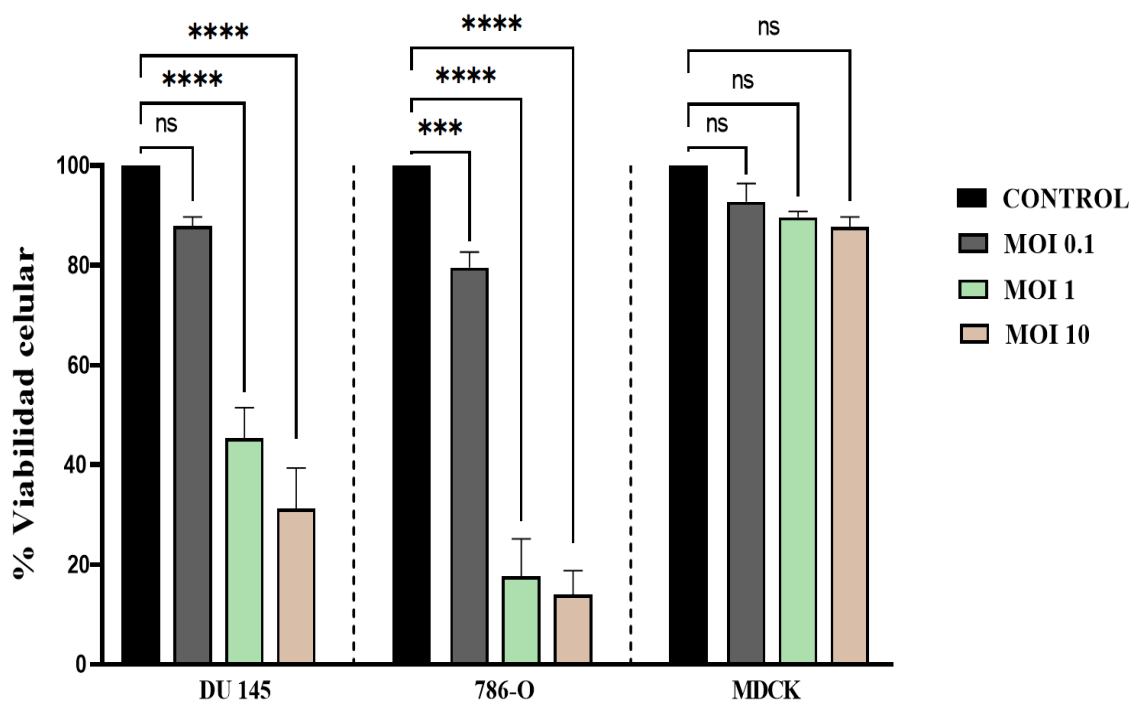


Figura 14. Citotoxicidad del virus rLS1 en células DU 145, 786-O y MDCK evaluada por ensayo MTS.

Por otro lado, los resultados mostraron que el virus rLS1-XII-v2 redujo significativamente la viabilidad de las células DU 145 al 82.4% con la MOI de 10 (\*\*  $p < 0.01$ ), mientras que, no hubo una disminución significativa con las MOIs de 0.1 y 1 con 90.7% y 87.9% respectivamente ( $p > 0.05$ ) (Figura 15). La viabilidad de las células 786-O se redujo al 62.3%, 38.2% y 22.2% con las MOIs de 0.1, 1 y 10 respectivamente (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ). En la línea celular MDCK no se observó una disminución significativa de la viabilidad celular con 98.8%, 98.6% y 91.4% ( $p > 0.05$ ). Los valores son expresados como la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes.

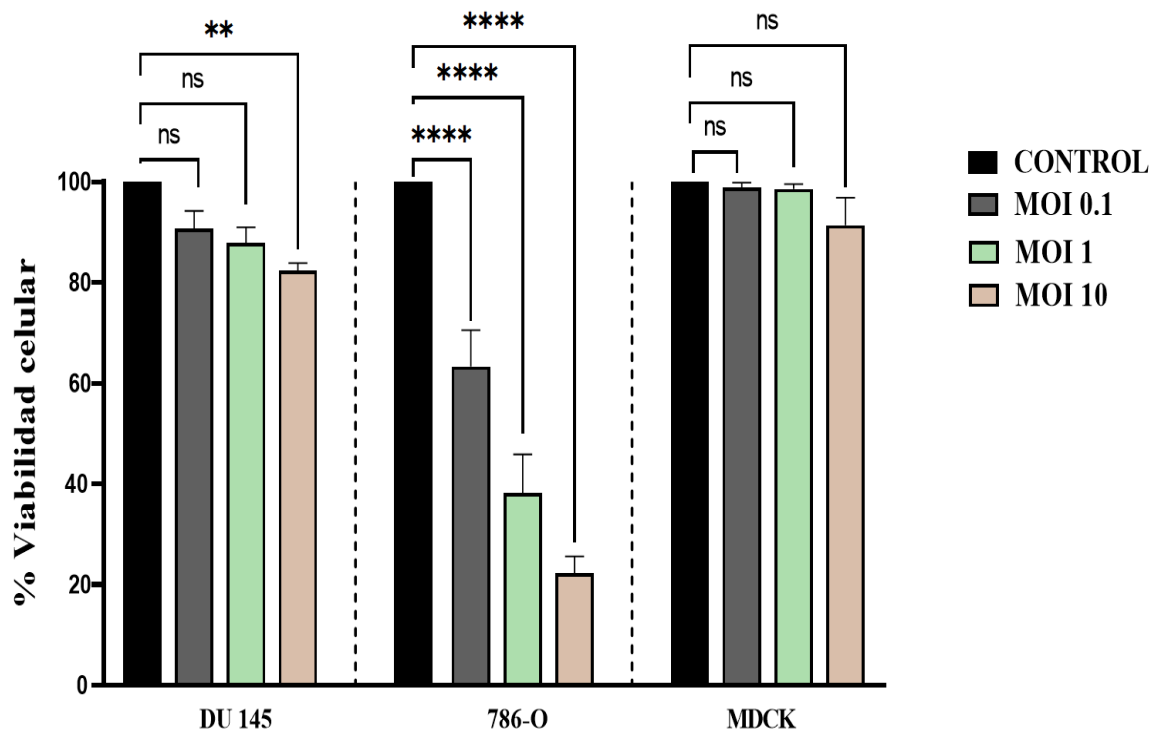


Figura 15. Citotoxicidad del virus rLS1-XII-v2 en células DU 145, 786-O y MDCK evaluada por ensayo MTS.

### 3.5. Apoptosis inducida por los virus rLS1 y rLS1-XII-v2 sobre líneas celulares tumorales

Los resultados muestran (Figura 16) que el virus rLS1 indujo apoptosis en la línea celular DU 145, el porcentaje promedio de células con apoptosis temprana positivas al marcaje de Anexina V-PE (Anexina V-PE+) fue de 17.46%, mientras que el porcentaje de células con apoptosis tardía (Anexina V-PE+/Sytox +) fue del 21.20% con respecto al control (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ). No hubo diferencia significativa entre el control y las células DU 145 infectadas con el virus rLS1-XII-v2, donde se detectó que el porcentaje de células apoptóticas tempranas fue de 9.03%, y el porcentaje de células apoptóticas tardías fue de 10.89% ( $p > 0.05$ ). Por otro lado, los virus rLS1 y rLS1-XII-v2 indujeron significativamente apoptosis en la línea tumoral 786-O. Con el virus rLS1 se detectó un porcentaje de células apoptóticas tempranas y tardías de 18.3% y 31.23% (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ), respectivamente con respecto al control, mientras que con el virus rLS1-XII-v2 se detectó un porcentaje de células con apoptosis temprana de 10.23% y apoptosis tardía de 14.8% (\* $p < 0.05$ ). Los valores son expresados como la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes.

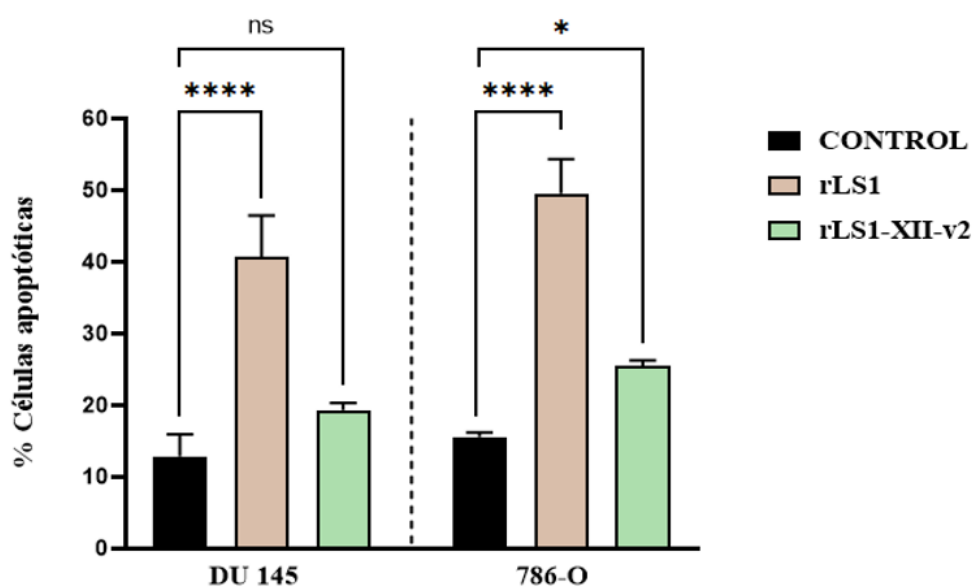


Figura 16. Detección de apoptosis por doble marcaje ANEXINA V-PE/SYTOX en células DU 145 y 786-O infectadas con los virus rLS1 y rLS1-XII-v2.

En la Figura 17 y 18, se muestra las 4 poblaciones distinguidas por el haz de luz láser del citómetro de flujo: el cuadrante inferior izquierdo indica la población de células viables (ANEXINA V-/SYTOX-), el cuadrante inferior derecho indica la población de células apoptóticas tempranas (ANEXINA V+), el cuadrante superior derecho indicaba la población de células apoptóticas tardías (ANEXINA V+/SYTOX+), finalmente, el cuadrante superior izquierdo indica la población de células necróticas (SYTOX+)

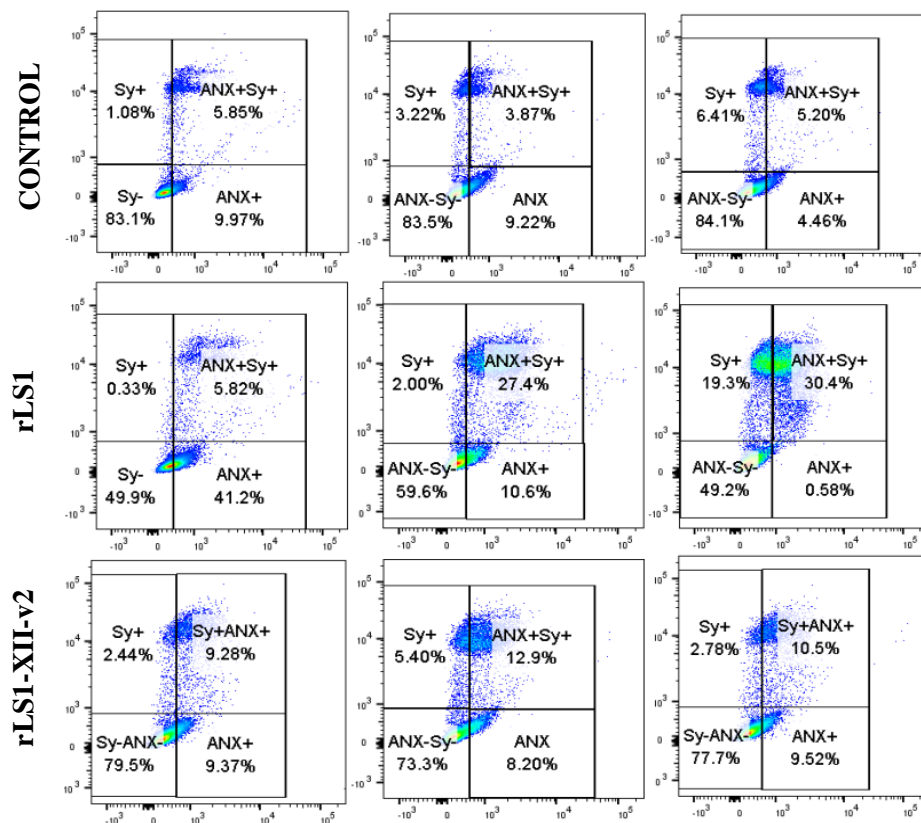


Figura 17. Análisis de cuadrantes de citometría de flujo de ANEXINA V-PE/SYTOX en la línea tumoral DU 145 infectada con los virus rLS1 y rLS1-XII-v2.

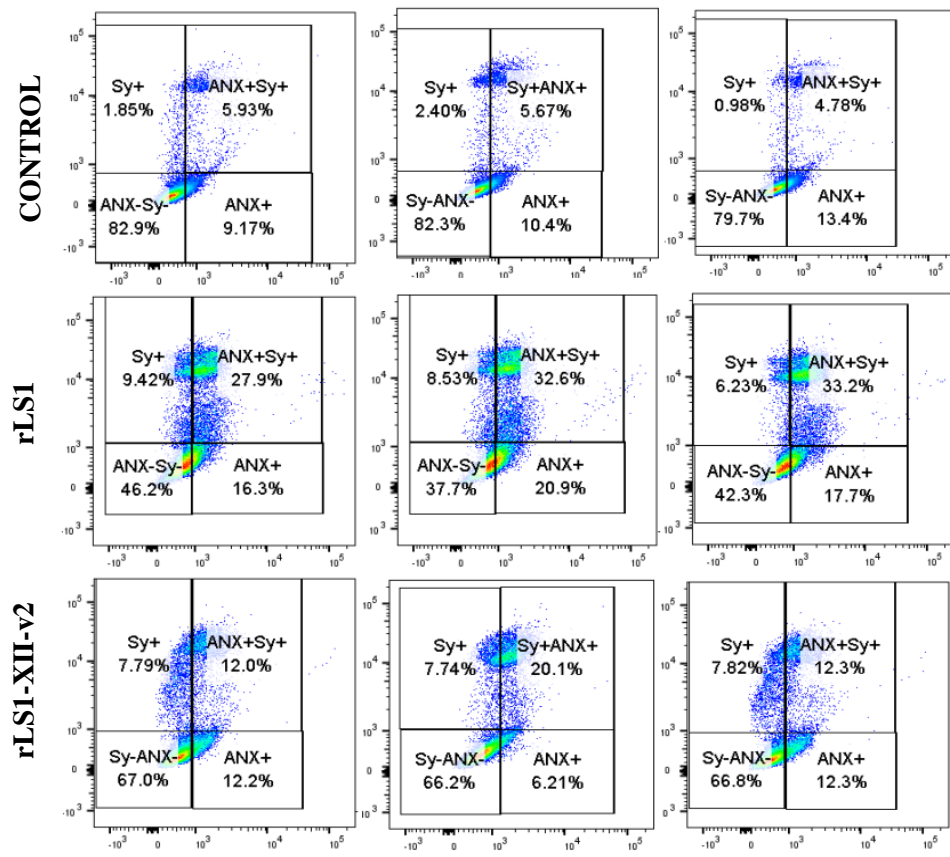


Figura 18. Análisis de cuadrantes de citometría de flujo de ANEXINA V-PE/SYTOX en la línea tumoral 786-O infectada con los virus rLS1 y rLS1-XII-v2.



#### IV. DISCUSIÓN

El virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) se ha convertido en un prometedor agente oncoterapéutico debido a su efectiva replicación sobre células tumorales sin ocasionar daños en células normales y a su capacidad de activar una respuesta inmunitaria antitumoral. En el año 1965, se reportó por primera vez las características antitumorales del NDV (58). Desde entonces, hasta la actualidad, se vienen realizando diversas investigaciones sobre los mecanismos antitumorales de NDV en diferentes líneas celulares.

En el presente estudio se evaluó el potencial oncolítico *in vitro* de la cepa vacunal LaSota (rLS1) y la cepa del NDV recombinante que contiene los genes F y HN correspondientes al genotipo XII (rLS1-XII-v2), sobre células de carcinoma prostático DU 145 y de cáncer de riñón 786-O.

Los resultados obtenidos muestran que ambas cepas del NDV presentan actividad oncolítica sobre las células tumorales DU 145 y 786-O. Mediante el ensayo MTS, se demostró que la infección de las líneas tumorales con ambos virus causa efectos citotóxicos mediante la disminución de la viabilidad celular, dado que solo las células tumorales infectadas perdieron la capacidad de convertir el tetrazolio del MTS a compuestos de formazán, obteniendo una menor absorbancia y por lo tanto un menor porcentaje de viabilidad celular en comparación a las células no infectadas. Además, se comprobó que la disminución de la viabilidad es dependiente de la multiplicidad de infección (MOI) utilizada. De este modo, las MOIs más altas (1 y 10) redujeron significativamente la viabilidad celular por debajo del 50% en las células DU 145 y por debajo del 20% en la línea celular 786-O, mientras que con la MOI más baja (0.1) no hubo reducción significativa de la viabilidad en ninguna de las líneas celulares tratadas con el virus rLS1. Por otro lado, la infección con el virus rLS1-XII-v2 redujo significativamente la viabilidad de las células DU 145 a un 82% con la MOI de 10, mientras que las tres MOIs utilizadas (0.1, 1, y 10) redujeron significativamente la viabilidad de la línea celular 786-O, con un 62%, 38%, y 22% respectivamente, demostrando que una mayor concentración viral intensifica la citotoxicidad. Además, al ser el MTS un ensayo colorimétrico permitió observar la coloración como indicador de la viabilidad ya que cuanto mayor fue la concentración de formazán, más intenso fue el color púrpura y por consiguiente hubo mayor viabilidad y absorbancia, a diferencia de las células tumorales infectadas con los NDVs, en las cuales no hubo reducción del tetrazol amarillo del MTS al formazán púrpura. Estos resultados son consistentes con otras investigaciones que demuestran que la infección

con NDV induce efectos citotóxicos en diferentes células tumorales, como en las líneas celulares de cáncer de tiroides anaplásico: THJ-16 T y THJ-29 T, en donde a causa de la infección con la MOI de 10 de la cepa recombinante rFMW/GFP del NDV, hubo una reducción significativa de la viabilidad celular por debajo del 50% en comparación con las células no infectadas utilizando el ensayo colorimétrico MTT (59). Del mismo modo, se reportó que la cepa recombinante rAF-IL12, indujo significativamente efectos citotóxicos sobre las líneas celulares de cáncer de mama humano: MDA-MB231 y MCF-7, además de no causar efectos citotóxicos en la línea celular normal de mama MCF-10A, demostrando su replicación selectiva y seguridad (60). Asimismo, se demostró que la cepa LaSota indujo efectos citotóxicos en la línea celular tumoral murina TC-1, perteneciente a células de cáncer de cuello uterino, en donde mediante el ensayo MTT se demostró la proliferación celular se redujo al 54% y 43% con MOIs de 20 y 40, en comparación a las células no infectadas usadas como control (44).

El NDV puede replicarse hasta 10 000 veces más en células tumorales debido a que tiene la capacidad de lisar selectivamente células tumorales y no se replica ni elimina células no tumorales (61) esto se debe a que las células neoplásicas presentan mutaciones que alteran la vía de señalización del interferón de tipo I, generando mayor susceptibilidad a la replicación viral (19). En este estudio, la selectividad de replicación también fue demostrada por el ensayo MTS, ya que los NDVs no causaron una disminución significativa de la viabilidad en la línea celular no tumoral MDCK con ninguna de las MOIs utilizadas. De igual manera, se demostró que ambos virus presentan una replicación selectiva por medio de la capacidad de adherencia que mantienen las células viables en el fondo del pocillo y a la capacidad del cristal violeta de penetrar células viables, en comparación a las células que se encuentran en fase de muerte celular a causa de la infección viral, dado que éstas pierden su capacidad de adherirse al fondo del pocillo, por lo tanto, el cristal violeta no penetra en ellas y no se observa coloración. De este modo, se demostró que con todas las MOIs utilizadas (0.01, 0.1, 1, 10, y 20) no hubo inhibición de la proliferación celular sobre la línea celular MDCK en comparación con las líneas celulares tumorales DU 145 y 786-O, en donde se observó ausencia completa de tinción en los pocillos infectados desde la MOI de 1 hasta la MOI de 20 con el virus rLS1, confirmando de esta manera, su seguridad y su replicación selectiva hacia células tumorales. Los resultados de ambos ensayos permitieron demostrar un perfil de replicación seguro dado que la infección con ambos virus no causó una disminución significativa de la viabilidad en las células MDCK confirmando que el NDV replica sin causar efectos citotóxicos sobre células no tumorales.

Diversas investigaciones han reportado que uno de los mecanismos que posee el NDV para la destrucción de las células tumorales es induciendo apoptosis a través de la activación de vías extrínsecas e intrínsecas (62). En este estudio, se demuestra la capacidad del NDV de inducir apoptosis sobre las células tumorales DU 145 y 786-O mediante el análisis de translocación de la fosfatidilserina, utilizando el marcaje con Anexina V-PE (apoptosis temprana) y el doble marcaje de Anexina V-PE/SYTOX (apoptosis tardía) detectada por citometría de flujo. En la línea celular DU 145 infectada con el virus rLS1 se determinó que el porcentaje total de apoptosis (temprana + tardía) fue mayor al 30%. Además, tanto rLS1 como rLS1-XII-v2 indujeron significativamente apoptosis sobre la línea celular tumoral 786-O con un 49% y 25% respectivamente. En todos los casos se detectó mayor porcentaje de células con apoptosis tardía, confirmando así que el NDV induce muerte celular por apoptosis en líneas celulares tumorales. Los resultados obtenidos muestran similitud con estudios anteriores, en donde se demostró que las cepas AF2240-i y rAF-IL12 del NDV inducen apoptosis temprana y tardía de manera significativa en la línea celular de cáncer de colon humano HT29 con respecto a las células no infectadas usadas como control mediante el ensayo de tinción con Anexina V/FITC (63). Del mismo modo, en un estudio similar, se demostró que la cepa LaSota del NDV induce significativamente apoptosis temprana y tardía sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7 en comparación con el grupo control no infectado, además de aumentar niveles de expresión de genes relacionados con la apoptosis (BAX, capasa-3 y caspasa-9) demostrando que el efecto antitumoral de NDV a través de vías apoptóticas (43).

Los resultados de los ensayos realizados demostraron que ambos virus presentaron capacidad oncolítica sobre las líneas celulares DU 145 y 786-O, y que la línea celular 786-O presentó mayor susceptibilidad al ser infectada tanto con el virus rLS1 como con el virus rLS1-XII-v2 en comparación a la línea celular DU 145. El cáncer renal es un tipo de cáncer muy heterogéneo con diversas mutaciones (64) lo que pudo activar los diversos mecanismos de NDV para generar una mayor susceptibilidad a la infección viral.

rLS1 presentó resultados con mayor significancia en comparación al virus rLS1-XII-v2. Estos resultados concuerdan con las características de replicación que mostraron ambos virus sobre las líneas celulares tumorales y la línea celular DF-1, en donde el virus rLS1 presentó mayor propagación viral y tuvo mayores títulos virales en todas las horas evaluadas de la cinética de replicación, mientras que el virus rLS1-XII-v2 tuvo una propagación viral restringida, además no presentó un efecto citopático (ECP) claro sobre las líneas celulares. Esto podría deberse al cambio de los dominios ecto y transmembrana de las proteínas F y HN por los del virus de NDV genotipo XII y al cambio del sitio de clivaje de la proteína F de polibásico a dibásico

para reducir su patogenicidad en aves (49), ya que es el principal determinante de la virulencia, lo que pudo haber reducido su efectividad oncolítica en algunas líneas celulares. No obstante, rLS1-XII-v2 inhibió la proliferación celular de manera significativa a un 63% y causó la pérdida total de adherencia con una dosis viral más baja que rLS1 en la línea celular 786-O. Estos resultados pueden indicar que existen líneas celulares que podrían presentar mayor susceptibilidad al virus rLS1-XII-v2 que aún no han sido evaluadas, demostrando que la actividad oncolítica de NDV depende del grado de virulencia y el tipo de cáncer.

Por diversas razones el NDV es considerado un virus oncolítico con mayor potencial para futuros ensayos clínicos, ya que además de su replicación selectiva sobre células tumorales y no tumorales, es un virus patogénico específico de las aves, de manera que los efectos secundarios en humanos están limitados a síntomas de gripe y aparición de conjuntivitis (65,66), también se ha demostrado que tiene la capacidad de inducir una respuesta inmunogénica antitumoral y el hecho de que su replicación se realice en el citoplasma impedirá la interacción e integración de su genoma viral en la célula huésped (67). Asimismo, se ha identificado que el NDV es un vector eficaz para expresar y administrar genes foráneos (24), por esta razón, se están realizando cada vez más investigaciones del uso de NDV recombinante para transportar diferentes genes que ayuden a potenciar su actividad oncoterapéutica (68,69)

Con los resultados obtenidos y los avances en viroterapia, creemos que la cepa rLS1 del NDV podría convertirse en una alternativa terapéutica contra el cáncer de próstata y cáncer de riñón. Además, se podrían realizar modificaciones mediante genética inversa, que mejoren su actividad oncolítica, insertando genes foráneos para aumentar la inducción de apoptosis o la modulación de respuesta inmune.

## V. CONCLUSIONES

1. La replicación de los virus rLS1 y rLS1-XII-v2, ocurre de manera diferencial dependiendo de la línea celular y lo hacen eficientemente sobre las líneas celulares DU 145 y 786-O.
2. Los virus rLS1 y rLS1-XII-v2, generan efecto citotóxico sobre las líneas celulares tumorales DU 145 y 786-O dependiente de la concentración viral o MOI y no generan efectos citotóxicos sobre la línea celular no tumoral MDCK.
3. El virus rLS1-XII-v2, inhibe la proliferación celular de manera significativa y causa la pérdida total de adherencia en la línea celular 786-O, con una dosis viral más baja que el virus rLS1
4. El virus rLS1 induce apoptosis en las líneas celulares 786-O y DU 145, mientras que el virus rLS1-XII-v2 solo lo hace en la línea celular tumoral 786-O.
5. La línea celular 786-O presenta mayor susceptibilidad al ser infectada con ambos virus, rLS1 y rLS1-XII-v2, en comparación a la línea celular DU 145.

## VI. RECOMENDACIONES

1. Evaluar el potencial oncolítico de las cepas rLS1 y rLS1-XII-v2 sobre otras líneas celulares tumorales.
2. Realizar ensayos adicionales *in vitro* que evalúen la activación de vías apoptóticas de los NDV sobre las líneas celulares DU 145 y 786-O, así como la utilización de cultivos en 3D que permitan imitar las características biológicas de los tumores.
3. Realizar ensayos *in vivo* evaluando la capacidad oncolítica de rLS1 contra el cáncer de riñón y de próstata que puedan servir como primera aproximación para definir ventajas y limitaciones en modelos *in vivo*.
4. Mediante la genética inversa, desarrollar un virus recombinante en base a la cepa LaSota que lleve genes foráneos en búsqueda de potenciar su actividad oncolítica con la inserción de genes foráneos para aumentar la inducción de apoptosis o estimular la respuesta inmune.
5. Caracterizar nuevas cepas del NDV que presenten eficacia oncolítica sobre células tumorales de cáncer de riñón y cáncer de próstata.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Who.int, Cáncer [Internet]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
2. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M et al. Global Cancer Observatory: Cancer Today. International Agency for Research on Cancer. 2020.
3. The global cancer observatory. International agency for research on cancer GLOBOCAN World Health Organization. Peru [Internet]. 2020. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/604-peru-fact-sheets.pdf>
4. Per GDEL. Boletín epidemiológico del Perú. Ministerio de Salud. 2019;28. Available from: <https://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2019/05.pdf>
5. Beltran H, Demichelis F. Prostate cancer: Inpatient heterogeneity in prostate cancer. *Nat Rev Urol* [Internet]. 2015;12(8):430–1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrurol.2015.182>
6. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol*. 2016;70(1):93–105.
7. Wang G, Zhao D, Spring DJ, Depinho RA. Genetics and biology of prostate cancer. 2018; Available from: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.315739>.
8. Shuch B, Amin A, Armstrong AJ, Eble JN, Ficarra V, Lopez-Beltran A, et al. Understanding Pathologic Variants of Renal Cell Carcinoma: Distilling Therapeutic Opportunities from Biologic Complexity. *Eur Urol*. 2015 Jan;67(1):85–97.
9. Bianchi M, Sun M, Jeldres C, Shariat SF, Trinh QD, Briganti A, et al. Distribution of metastatic sites in renal cell carcinoma: a population-based analysis. *Annals of Oncology*. 2012 Apr;23(4):973–80.
10. Maughan KL, Lutterbie MA, Ham PS. Treatment of Breast Cancer [Internet]. Vol. 81, *Am Fam Physician*. 2010. Available from: [www.aafp.org/afpAmericanFamilyPhysician1339](http://www.aafp.org/afpAmericanFamilyPhysician1339)
11. Wang JJ, Lei KF, Han F. Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments.
12. Schatten H. Brief overview of prostate cancer statistics, grading, diagnosis and treatment strategies. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC; 2018. p. 1–14.
13. Geynisman DM, Maranchie JK, Ball MW, Bratslavsky G, Singer EA. A 25 year perspective on the evolution and advances in an understanding of the biology, evaluation and treatment of kidney cancer. Vol. 39, *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. Elsevier Inc.; 2021. p. 548–60.
14. Lyman GH, Abella E, Pettengell R. Risk factors for febrile neutropenia among patients with cancer receiving chemotherapy: A systematic review. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet]. 2014;90(3):190–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.12.006>

15. Hughes JR, Parsons JL. Flash radiotherapy: Current knowledge and future insights using proton-beam therapy. *Int J Mol Sci.* 2020;21(18):1–14.
16. Raja J, Ludwig JM, Gettinger SN, Schalper KA, Kim HS. Oncolytic virus immunotherapy: future prospects for oncology. *J Immunother Cancer.* 2018;6(1):1–13.
17. Stephen J Russell, Kah-Whye Peng and JCB. Oncolytic virotherapy. *Physiol Behav.* 2016;176(1):139–48.
18. Lawler SE, Speranza MC, Cho CF, Chiocca EA. Oncolytic viruses in cancer treatment a review. *JAMA Oncol.* 2017;3(6):841–9.
19. Plataniias LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(5):375–86.
20. Kaufman HL, Kohlhapp FJ, Zloza A. Oncolytic viruses: A new class of immunotherapy drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2015;14(9):642–62.
21. Chaurasiya S, Chen NG, Fong Y. Oncolytic viruses and immunity. *Curr Opin Immunol.* 2018;51:83–90.
22. Lazar I, Perlman R, Lotem M, Peretz T, Ben-Yehuda D, Kadouri L. The clinical effect of the inhibitor of apoptosis protein livin in melanoma. *Oncology.* 2012;82(4):197–204.
23. Aghi M, Visted T, DePinho RA, Chiocca EA. Oncolytic herpes virus with defective ICP6 specifically replicates in quiescent cells with homozygous genetic mutations in p16. *Oncogene.* 2008;27(30):4249–54.
24. Pan Z, He J, Rasoul LM, Liu Y, Che R, Ding Y, et al. Identification of optimal insertion site in Recombinant Newcastle Disease Virus (rNDV) vector expressing foreign gene to enhance its anti-tumor effect. *PLoS One.* 2016;11(10):1–13.
25. Wang ZA, Mitrofanova A, Bergren SK, Abate-Shen C, Cardiff RD, Califano A, et al. Lineage analysis of basal epithelial cells reveals their unexpected plasticity and supports a cell-of-origin model for prostate cancer heterogeneity. *Nat Cell Biol.* 2013 Mar;15(3):274–83.
26. Jiang K, Song C, Kong L, Hu L, Lin G, Ye T, et al. Recombinant oncolytic Newcastle disease virus displays antitumor activities in anaplastic thyroid cancer cells. *BMC Cancer.* 2018;18(1):1–10.
27. Galanis E, Markovic SN, Suman VJ, Nuovo GJ, Vile RG, Kottke TJ, et al. Phase II trial of intravenous administration of reolysin® (reovirus serotype-3-dearing strain) in patients with metastatic melanoma. *Molecular Therapy.* 2012;20(10):1998–2003.
28. Sinkovics JG, Horvath JC. Newcastle disease virus (NDV): Brief history of its oncolytic strains. *Journal of Clinical Virology.* 2000;16(1):1–15.
29. Cassel WA, Garrett RE. Newcastle disease virus as an antineoplastic agent. *Cancer.* 1965;18(7):863–8.
30. Freeman AI, Zakay-Rones Z, Gomori JM, Linetsky E, Rasooly L, Greenbaum E, et al. Phase I/II trial of intravenous NDV-HUJ oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme. *Molecular Therapy.* 2006;13(1):221–8.



31. Kirkland PD, Stephano A, Weingartl HM. Paramyxoviruses. *Diseases of Swine*. 2019;16(4):594–610.
32. Cattoli G, Susta L, Terregino C, Brown C. Newcastle disease: A review of field recognition and current methods of laboratory detection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2011;23(4):637–56.
33. Dimitrov KM, Afonso CL, Yu Q, Miller PJ. Newcastle disease vaccines—A solved problem or a continuous challenge? *Vet Microbiol*. 2017;(January).
34. Ganar K, Das M, Sinha S, Kumar S. Newcastle disease virus: Current status and our understanding. *Virus Res*. 2014;(184):71–81.
35. Yuan P, Paterson RG, Leser GP, Lamb RA, Jardetzky TS. Structure of the Ulster Strain Newcastle Disease Virus Hemagglutinin-Neuraminidase Reveals Auto-Inhibitory Interactions Associated with Low Virulence. *PLoS Pathog*. 2012 Aug;8(8).
36. Tan L, Zhang Y, Zhan Y, Yuan Y, Sun Y, Qiu X, et al. Newcastle disease virus employs macropinocytosis and Rab5a-dependent intracellular trafficking to infect DF-1 cells [Internet]. Vol. 7, *Oncotarget*. 2016. Available from: [www.impactjournals.com/oncotarget/](http://www.impactjournals.com/oncotarget/)
37. Diel DG, Susta L, Garcia SC, Killian ML, Brown CC, Miller PJ, et al. Complete genome and clinicopathological characterization of a virulent newcastle disease virus isolate from South America. *J Clin Microbiol*. 2012;50(2):378–87.
38. Abolnik C, Horner RF, Bisschop SPR, Parker ME, Romito M, Viljoen GJ. A phylogenetic study of South African Newcastle disease virus strains isolated between 1990 and 2002 suggests epidemiological origins in the Far East. *Arch Virol*. 2004 Mar;149(3):603–19.
39. Ke GM, Liu HJ, Lin MY, Chen JH, Tsai SS, Chang PC. Molecular characterization of Newcastle disease viruses isolated from recent outbreaks in Taiwan [Internet]. Vol. 97, *Journal of Virological Methods*. 2001. Available from: [www.elsevier.com/locate/jviromet](http://www.elsevier.com/locate/jviromet)
40. Peeters BPH, de Leeuw OS, Koch G, Gielkens ALJ. Rescue of Newcastle Disease Virus from Cloned cDNA: Evidence that Cleavability of the Fusion Protein Is a Major Determinant for Virulence. *J Virol*. 1999;73(6):5001–9.
41. Schirmacher V, Griesbach A, Ahlert T. Antitumor effects of Newcastle Disease Virus in vivo: local versus systemic effects. *Int J Oncol*. 2001;18(5):945–52.
42. Ginting T, Suryatenggara J, Christian S, Mathew G. Proinflammatory response induced by Newcastle disease virus in tumor and normal cells. *Oncolytic Virother*. 2017;Volume 6:21–30.
43. Kalantari A, Farashi Bonab S, Keyvanfar H, Mortazavi P. Evaluation of apoptosis induction by newcastle disease virus lasota strain in human breast carcinoma cells. *Arch Razi Inst*. 2020 Jun 1;75(3):367–76.
44. Keshavarz M, Nejad ASM, Esghaei M, Bokharai-Salim F, Dianat-Moghadam H, Keyvani H, et al. Oncolytic Newcastle disease virus reduces growth of cervical cancer cell by inducing apoptosis. *Saudi J Biol Sci*. 2020 Jan 1;27(1):47–52.

45. Yan Y, Su C, Hang M, Huang H, Zhao Y, Shao X, et al. Recombinant Newcastle disease virus rL-RVG enhances the apoptosis and inhibits the migration of A549 lung adenocarcinoma cells via regulating alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors in vitro. *Virol J.* 2017 Oct 3;14(1).
46. Santos MR, Xavier PLP, Pires PRL, Rochetti AL, Rosim DF, Scagion GP, et al. Oncolytic effect of Newcastle disease virus is attributed to interferon regulation in canine mammary cancer cell lines. *Vet Comp Oncol.* 2021 Sep 1;19(3):593–601.
47. Chumbe A, Izquierdo-Lara R, Tataje-Lavanda L, Figueroa A, Segovia K, Gonzalez R, et al. Characterization and sequencing of a genotype XII Newcastle disease virus isolated from a peacock (*Pavo cristatus*) in Peru. *Genome Announc.* 2015;3(4):4–5.
48. Chumbe A, Izquierdo-Lara R, Calderón K, Fernández-Díaz M, Vakharia VN. Development of a novel Newcastle disease virus (NDV) neutralization test based on recombinant NDV expressing enhanced green fluorescent protein. *Virol J.* 2017;14(1):1–11.
49. Izquierdo-Lara R, Chumbe A, Calderón K, Fernández-Díaz M, Vakharia VN. Genotype-matched Newcastle disease virus vaccine confers improved protection against genotype XII challenge: The importance of cytoplasmic tails in viral replication and vaccine design. *PLoS One.* 2019;14(11):1–16.
50. The World Organisation for Animal Health (OIE). Newcastle disease [Internet]. [cited 2022 Jul 4]. Available from: <https://www.oie.int/en/disease/newcastle-disease/>
51. Gaupel AC, Wang WLW, Mordan-McCombs S, Yu Lee EC, Tenniswood M. Xenograft, Transgenic, and Knockout Models of Prostate Cancer. *Animal Models for the Study of Human Disease.* Elsevier; 2013. 973–995 p.
52. Brodaczevska KK, Szczylik C, Fiedorowicz M, Porta C, Czarnecka AM. Choosing the right cell line for renal cell cancer research. *Mol Cancer* [Internet]. 2016;15(1):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12943-016-0565-8>
53. Expasy. Swiss bioinformatics Resource Portal [Internet]. Available from: [https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL\\_1051](https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_1051)
54. Colección American Type Culture ATCC. MDCK (NBL-2) [Internet]. Available from: <https://www.atcc.org>
55. Calderón K, Rojas-Neyra A, Carbajal-Lévano B, Luján-Valenzuela L, Ticona J, Isasi-Rivas G, et al. A Recombinant Turkey Herpesvirus Expressing the F Protein of Newcastle Disease Virus Genotype XII Generated by NHEJ-CRISPR/Cas9 and Cre-LoxP Systems Confers Protection against Genotype XII Challenge in Chickens. *Viruses.* 2022 Apr 1;14(4).
56. Díaz MF, Calderón K, Rojas-Neyra A, Vakharia VN, Choque-Guevara R, Montalvan-Avalos A, et al. Intranasal vaccination of hamsters with a Newcastle disease virus vector expressing the S1 subunit protects animals against SARS-CoV-2 disease. *Sci Rep.* 2022 Dec 1;12(1).
57. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Newcastle Disease. 2021;Chapter 3.3.14.

58. Cassel WA, Earl Garrett R. Newcastle disease virus as an antineoplastic agent. *Cancer*. 1965;18.
59. Jiang K, Song C, Kong L, Hu L, Lin G, Ye T, et al. Recombinant oncolytic Newcastle disease virus displays antitumor activities in anaplastic thyroid cancer cells. *BMC Cancer*. 2018 Jul 18;18(1).
60. Mohamed Amin Z, Che Ani MA, Tan SW, Yeap SK, Alitheen NB, Syed Najmuddin SUF, et al. Evaluation of a Recombinant Newcastle Disease Virus Expressing Human IL12 against Human Breast Cancer. *Sci Rep*. 2019 Dec 1;9(1).
61. Reichard KW, Lorence RM, Cascino CJ, Peeples ME, Walter RJ, Fernando MB, et al. Newcastle Disease Virus Selectively Kills Human Tumor Cells'. *Journal of Virology*. 2006 Aug;80(15):7522–34.
62. Elankumaran S, Rockemann D, Samal SK. Newcastle Disease Virus Exerts Oncolysis by both Intrinsic and Extrinsic Caspase-Dependent Pathways of Cell Death. *J Virol*. 2006 Aug;80(15):7522–34.
63. Najmuddin SUFS, Amin ZM, Tan SW, Yeap SK, Kalyanasundram J, Veerakumarasivam A, et al. Oncolytic effects of the recombinant Newcastle disease virus, rAF-IL12, against colon cancer cells in vitro and in tumor-challenged NCr-Foxn1nu nude mice. *PeerJ*. 2020 Dec 8;8.
64. Linehan WM, Ricketts CJ. The Cancer Genome Atlas of renal cell carcinoma: findings and clinical implications. Vol. 16, *Nature Reviews Urology*. Nature Publishing Group; 2019. p. 539–52.
65. Freeman AI, Zakay-Rones Z, Gomori JM, Linetsky E, Rasooly L, Greenbaum E, et al. Phase I/II trial of intravenous NDV-HUJ oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme. *Molecular Therapy*. 2006 Jan;13(1):221–8.
66. Pecora AL, Rizvi N, Cohen GI, Meropol NJ, Serman D, Marshall JL, et al. Phase I trial of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, in patients with advanced solid cancers. *Journal of Clinical Oncology*. 2002 May 1;20(9):2251–66.
67. Schirmacher V. Fifty years of clinical application of newcastle disease virus: Time to celebrate! Vol. 4, *Biomedicines*. MDPI AG; 2016.
68. Wu Y, Zhang X, Wang X, Wang L, Hu S, Liu X, et al. Apoptin enhances the oncolytic properties of newcastle disease virus. *Intervirology*. 2012 Apr;55(4):276–86.
69. Zamarin D, Martínez-Sobrido L, Kelly K, Mansour M, Sheng G, Vigil A A, et al. Enhancement of oncolytic properties of recombinant newcastle disease virus through antagonism of cellular innate immune responses. *Molecular Therapy*. 2009;17(4):697–706.

## VIII. ANEXOS

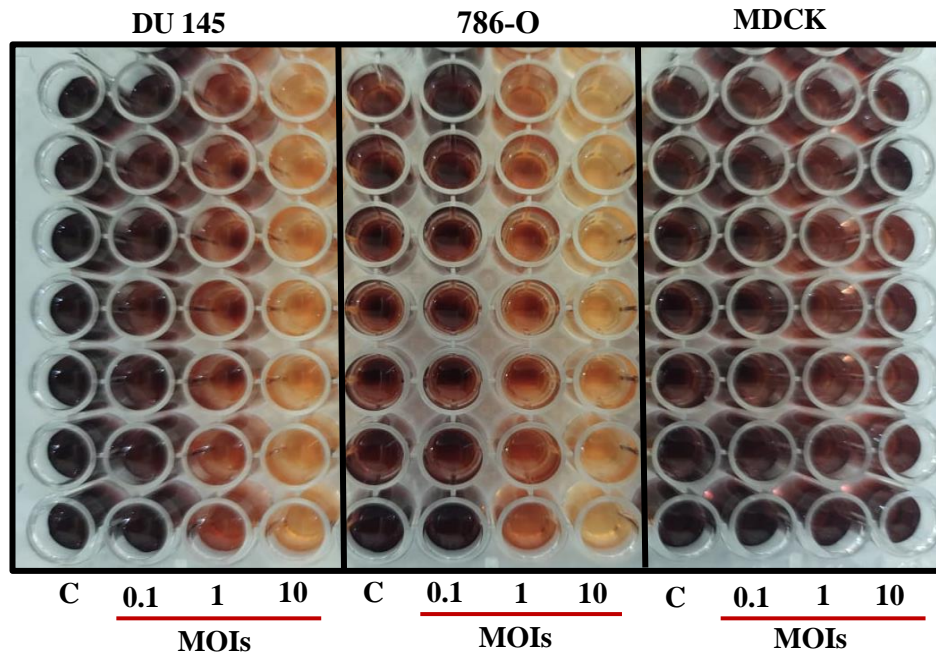


Figura 19. Fotografía de placas de cultivo celular después de la incubación con el reactivo MTS para la determinación de citotoxicidad del virus rLS1 en células DU 145, 786-O y MDCK.

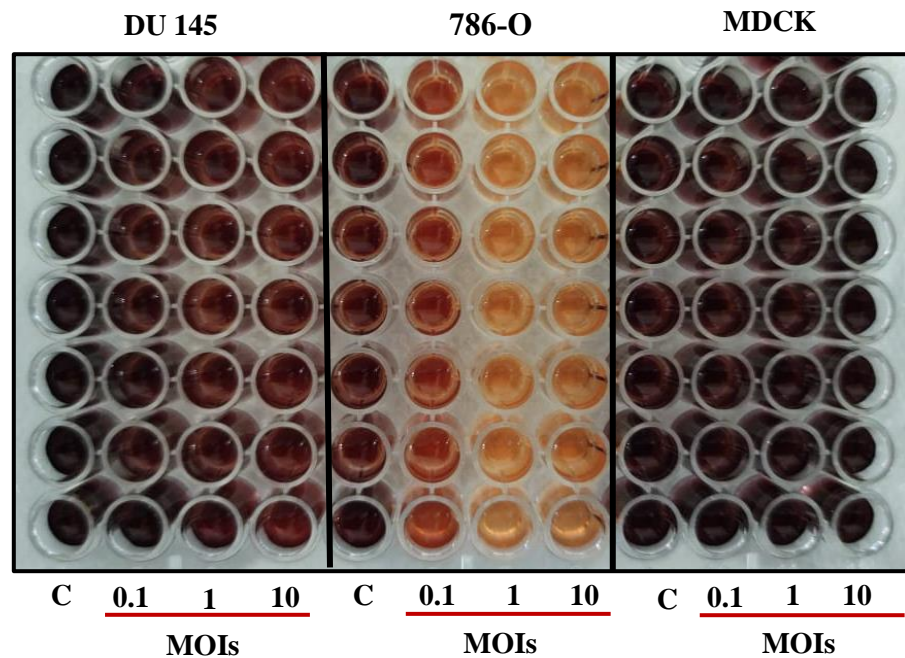


Figura 20. Fotografía de placas de cultivo celular después de la incubación con el reactivo MTS para la determinación de citotoxicidad del virus rLS1-XII-v2 en células DU 145, 786-O y MDCK.

	DU 145				786-O				MDCK				
	Control	MOIs			Control	MOIs			Control	MOIs			
		0.1	1	10		0.1	1	10		0.1	1	10	
A	3.535	3.282	2.174	1.359	3.678	2.912	0.456	0.472	3.621	2.448	2.906	3.045	490
B	3.898	3.04	1.995	1.351	3.579	2.728	0.472	0.459	3.284	3.047	2.995	2.958	490
C	3.764	3.353	1.982	1.352	3.375	2.916	1.252	0.505	3.419	2.986	2.916	3.021	490
D	3.946	3.425	1.787	1.628	3.334	2.762	0.572	0.52	3.605	3.19	2.777	3.02	490
E	3.894	3.635	1.722	1.446	3.61	2.821	0.853	0.447	3.458	3.612	2.968	2.922	490
F	3.992	3.448	1.772	1.692	3.67	2.345	1.355	0.472	2.943	3.174	2.962	2.946	490
G	3.613	3.602	2.141	1.475	3.638	2.42	1.13	0.494	3.889	3.86	3.553	3.214	490

	DU 145				786-O				MDCK				
	Control	MOIs			Control	MOIs			Control	MOIs			
		0.1	1	10		0.1	1	10		0.1	1	10	
A	3.562	3.052	1.236	1.209	3.617	2.757	0.462	0.42	3.749	3.578	3.343	3.285	490
B	3.488	2.915	1.702	1.118	3.862	3.095	0.467	0.391	3.95	3.498	3.338	3.257	490
C	3.697	3.01	2.037	1.217	3.684	3.15	0.481	0.411	3.733	3.576	3.31	3.351	490
D	3.421	3.08	2.027	1.111	3.534	3.141	0.473	0.392	3.579	3.539	3.348	3.275	490
E	3.499	3.271	2.083	1.222	3.805	3.252	0.474	0.38	3.586	3.489	3.332	3.269	490
F	3.46	3.312	1.446	1.016	3.656	3.176	0.44	0.386	3.54	3.541	3.327	3.279	490
G	3.379	3.11	1.392	1.057	3.631	3.239	0.44	0.403	3.469	3.578	3.346	3.273	490

	DU 145				786-O				MDCK				
	Control	MOIs			Control	MOIs			Control	MOIs			
		0.1	1	10		0.1	1	10		0.1	1	10	
A	3.302	2.662	1.485	0.793	3.302	2.469	0.312	0.387	3.119	3.017	2.98	2.75	490
B	3.299	2.806	1.276	0.835	3.142	2.528	0.498	0.371	3.099	2.727	2.899	2.799	490
C	3.616	3.669	1.118	1.2	3.105	2.565	0.438	0.397	2.928	2.897	2.799	2.769	490
D	3.197	2.854	1.285	0.58	3.65	2.626	0.365	0.374	3.669	3.171	3.079	2.688	490
E	3.254	2.593	1.319	0.668	3.255	2.663	0.49	0.391	3.157	3.01	2.928	2.911	490
F	3.273	2.497	1.253	0.721	3.115	2.584	0.723	0.382	3.125	2.798	2.789	2.802	490
G	3.255	2.862	1.224	0.438	3.142	2.782	0.372	0.325	3.422	2.73	2.69	2.65	490

Figura 21. Densidades ópticas de los experimentos realizados para la determinación de citotoxicidad del virus rLS1 en células DU 145, 786-O y MDCK por ensayo MTS.

	DU 145				786-O				MDCK			
	Control	MOIs			Control	MOIs			Control	MOIs		
		0.1	1	10		0.1	1	10		0.1	1	10
A	3.455	3.262	2.851	2.915	2.271	2.096	1.042	0.57	3.313	3.381	3.126	3.22
B	3.437	2.89	2.215	2.867	2.814	1.999	0.921	0.611	3.559	3.108	3.158	3.359
C	3.371	2.937	3.247	2.792	3.443	1.896	1.003	0.568	2.963	3.324	3.307	3.228
D	3.486	3.214	3.11	2.882	3.22	1.878	0.816	0.541	3.341	3.112	3.254	3.327
E	3.465	3.306	3.216	2.817	3.43	2.097	0.912	0.698	3.45	3.349	3.527	3.316
F	3.145	2.774	2.862	2.876	3.21	1.981	1.18	0.608	3.658	3.509	3.365	3.189
G	3.138	2.787	3.212	2.955	2.871	2.078	0.952	0.492	3.35	3.374	3.399	3.345

	DU 145				786-O				MDCK			
	Control	MOIs			Control	MOIs			Control	MOIs		
		0.1	1	10		0.1	1	10		0.1	1	10
A	2.876	3.263	2.683	3.101	3.374	1.685	0.908	0.674	3.079	3.283	3.279	2.881
B	3.757	3.376	3.119	2.92	3.113	1.598	0.926	0.671	3.081	3.404	3.437	2.779
C	3.868	2.682	3.278	2.925	3.202	1.629	1.036	0.672	3.345	3.638	2.823	2.989
D	3.799	2.665	3.282	2.904	3.243	1.636	1.279	0.67	3.733	3.679	2.989	2.942
E	3.716	3.294	3.252	2.982	2.753	1.637	1.213	0.687	3.679	3.672	3.219	2.651
F	3.942	3.281	3.479	3.122	3.066	1.622	1.048	0.674	3.089	3.091	3.869	2.947
G	3.412	3.677	2.699	2.915	3.244	1.629	1.275	0.68	3.233	2.648	2.842	2.822

	DU 145				786-O				MDCK			
	Control	MOIs			Control	MOIs			Control	MOIs		
		0.1	1	10		0.1	1	10		0.1	1	10
A	3.603	3.513	3.423	2.976	3.683	2.452	1.686	0.892	3.77	3.703	3.96	3.188
B	3.731	3.239	3.317	2.847	3.472	2.329	1.288	0.918	3.67	3.703	3.64	3.088
C	3.656	3.343	3.202	3.229	3.559	2.364	1.698	0.92	3.687	3.668	3.58	3.382
D	3.597	3.472	3.438	3.089	3.447	2.399	1.52	0.898	3.65	3.71	3.593	3.706
E	3.63	3.42	3.312	2.835	3.304	2.495	1.549	0.914	3.658	3.43	3.39	3.227
F	3.622	3.518	3.3	2.788	3.565	2.376	1.698	0.881	3.494	3.704	3.43	3.283
G	3.663	3.576	3.343	2.856	3.472	2.368	1.52	0.917	3.459	3.509	3.689	3.172

Figura 22. Densidades ópticas de los experimentos realizados para la determinación de citotoxicidad del virus rLS1-XII-v2 en células DU 145, 786-O y MDCK por ensayo MTS.

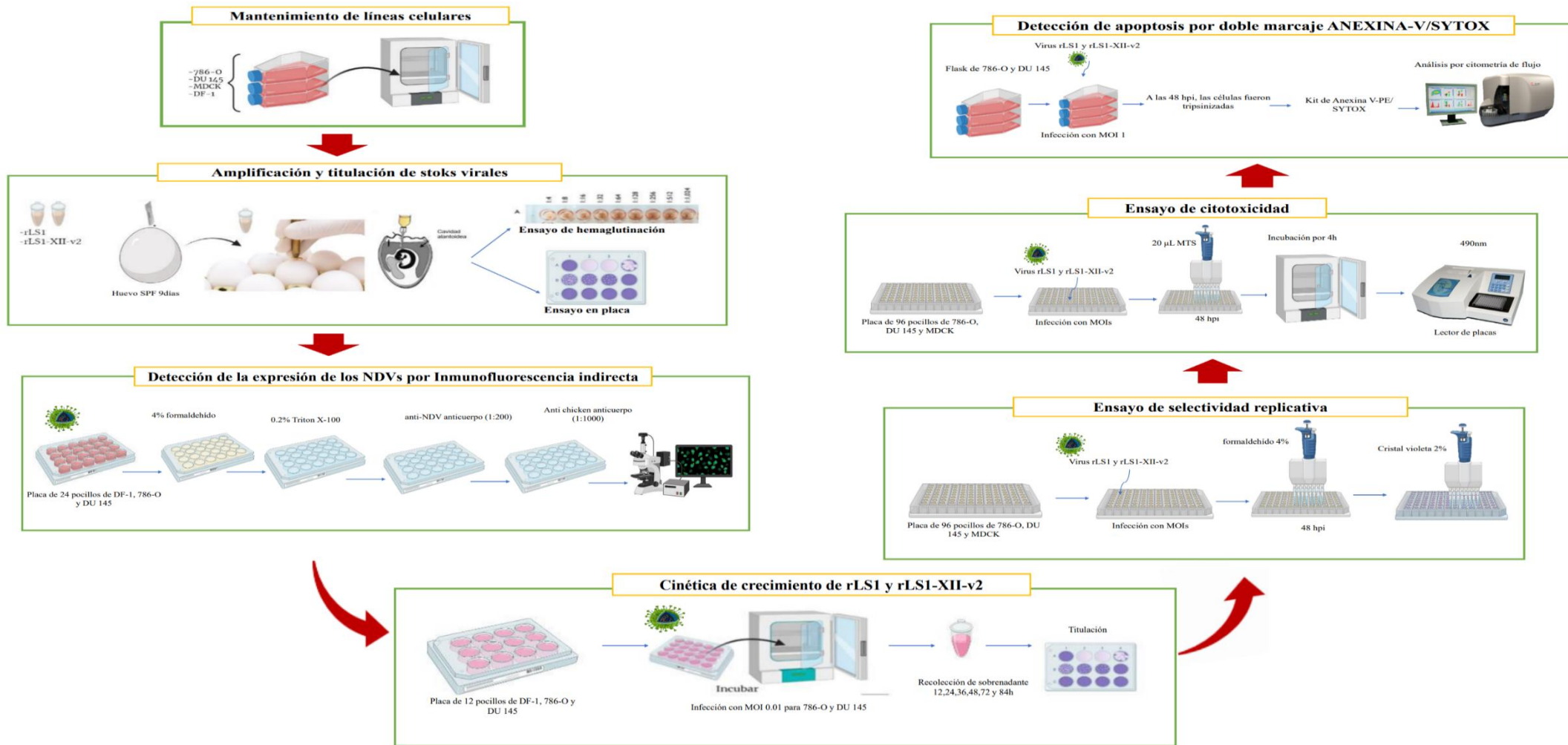


Figura 23. Flujograma de ensayos realizados para la determinación del potencial oncolítico de los virus rLS1 y rLS1-XII-v2 sobre las líneas celulares DU 145, 786-O y MDCK.