

Evaluación de la actividad oncolítica del virus de la enfermedad de Newcastle (rLS1) en líneas celulares de carcinoma prostático y renal humano

Evaluation of the oncolytic activity of Newcastle disease virus (rLS1) in human prostate and renal carcinoma cell lines

Gloria Guerrero-Fonseca^{1,a}, Brighth Carbajal-Lévano^{1,b}, Aldo Rojas-Neyra^{1,c}, Astrid Poma-Acevedo^{1,d}, Freddy Ygnacio^{1,e}, Katherine Calderón^{1,f}, Manolo Fernández-Sánchez^{1,g}, Manolo Fernández-Díaz^{1,h}

¹ Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Farvet S.A.C. Chíncha Alta, Perú.

^a Bióloga

^b Bióloga

^c Máster en virología

^d Máster en inmunología

^e Bachiller en ciencias biológicas

^f Máster en virología

^g Doctor

^h Doctor

An Fac med. 2025;86(1):6-13./ DOI: <https://doi.org/10.15381/anales.v86i1.29785>

Correspondencia:

Aldo Rojas Neyra

Aldo.s@farvet.com

Recibido: 20 de diciembre 2024

Aprobado: 17 de febrero 2025

Publicación en línea: 28 de marzo 2025

Conflictos de interés: Todos los autores laboran en los laboratorios de investigación y desarrollo de Farvet S.A.C.

Fuente de financiamiento: Estudio co-financiado por Farvet S.A.C. y PROCENCIA – Concytec, mediante el contrato n° 143-2017-FONDECYT

Contribuciones de autoría: GGF: investigación, análisis formal, escritura-preparación del borrador original. BCL: investigación, análisis formal, escritura-preparación del borrador original. ARN: conceptualización, metodología, validación, escritura-revisión; edición. APA: investigación y análisis formal. FY: investigación y análisis formal. KC: conceptualización, metodología, validación, administración del proyecto, visualización y escritura-revisión; edición. MFS: conceptualización y visualización y escritura-revisión; edición. MFD: conceptualización, adquisición de fondos, administración del proyecto y escritura-revisión; edición.

El presente estudio forma parte de la tesis: Gloria Guerrero-Fonseca. *Potencial oncolítico del virus de la enfermedad de Newcastle en líneas celulares tumorales [tesis para optar al título de biólogo].* Ica: Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional San Luis Gonzaga; 2023

Citar como: Guerrero-Fonseca G, Carbajal-Lévano B, Rojas-Neyra A, Poma-Acevedo A, Ygnacio F, Calderón K, et al. Evaluación de la actividad oncolítica del virus de la enfermedad de Newcastle (rLS1) en líneas celulares de carcinoma prostático y renal humano. *An Fac med.* 2025;86(1):6-13. DOI: <https://doi.org/10.15381/anales.v86i1.29785>



Resumen

Introducción. La viroterapia oncolítica se ha convertido en un método novedoso para el tratamiento del cáncer. El virus de la enfermedad de Newcastle (vENC) presenta potencial oncolítico y replicación selectiva en células tumorales. El cáncer de próstata y renal humano son una de las principales causas de muerte a nivel mundial. **Objetivo.** Evaluar la actividad oncolítica del constructo viral rLS1 sobre las líneas celulares de carcinoma prostático (DU-145) y cáncer renal (786-O), y evaluar su replicación selectiva en ambas líneas tumorales y en la línea celular no tumoral de riñón canino Madin-Darby (MDCK). **Métodos.** La efectividad oncolítica fue determinada mediante la reducción de viabilidad celular y apoptosis, usando el ensayo colorimétrico (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxi-fenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio) (MTS) y el marcaje con annexin V/ANXA5-PE/SYTOX Blue Dead Cell, respectivamente. La selectividad replicativa viral en las células fue evaluada por tinción con cristal violeta. **Resultados.** El ensayo de MTS determinó que el virus rLS1 redujo significativamente el porcentaje de viabilidad celular ($p < 0,0001$) en ambas líneas celulares tumorales, sin causar una reducción significativa de la viabilidad celular en las células MDCK en comparación a las células no infectadas. Se demostró un aumento significativo ($p < 0,0001$) del porcentaje de células apoptóticas en las células 786-O y DU-145 infectadas con rls1 en comparación a las células no infectadas. **Conclusión:** Se demostró que el constructo viral rLS1 presentó potencial oncolítico selectivo sobre células de cáncer de próstata y de riñón humano, convirtiéndose en un posible agente antitumoral.

Palabras clave: Neoplasias; Virus de la Enfermedad de Newcastle; Viroterapia Oncolítica; Apoptosis; Carcinoma de Células Renales; Cáncer de próstata (fuente: DeCS BIREME).

Abstract

Introduction. Oncolytic virotherapy has emerged as a novel method for treating cancer. The Newcastle disease virus (NDV) exhibits oncolytic potential and selectively replicates in tumor cells. Human prostate and renal cancer are the leading causes of death worldwide. **Objective.** To evaluate the oncolytic activity of the rLS1 viral construct on prostate carcinoma (DU-145) and renal cancer (786-O) cell lines, as well as its selective replication in both tumor lines and the non-tumoral Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell line. **Methods.** The oncolytic effectiveness was determined by reducing cell viability and apoptosis using the (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-5-[3-carboxymethoxyphenyl]-2-[4-sulphophenyl]-2H-tetrazolium) MTS colorimetric assay and by labeling with annexin V/ANXA5-PE/SYTOX Blue Dead Cell, respectively. The viral replicative selectivity in cells was evaluated by crystal violet staining. **Results.** The MTS assay determined that rls1 significantly reduced viability ($p < 0,0001$) in both tumor cell lines without causing a significant reduction in the viability of MD DPBS 1X CK cells compared to uninfected cells. A significant increase ($p < 0,0001$) in the percentage of apoptotic cells was observed in 786-O and DU-145 cells infected with rLS1 compared to uninfected cells. **Conclusion.** The results indicate that rLS1 demonstrated selective oncolytic potential in human prostate and renal cancer cells, suggesting its potential as an antitumoral agent.

Keywords: Neoplasms; Newcastle Disease Virus; Oncolytic Virotherapy; Apoptosis; Carcinoma, Renal Cell; Prostatic Neoplasms (Source: MeSH NLM).

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. En el 2022, en el Perú se reportó 2460 muertes por cáncer de próstata, mientras que, hubo 802 muertes por cáncer renal⁽¹⁾. A pesar de los avances terapéuticos, el cáncer persiste como un desafío en la salud humana, por este motivo, es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas que sean menos invasivas y más eficaces⁽²⁾. La viroterapia se ha convertido en una herramienta prometedora, ya que usa los virus oncolíticos (VOs) que pueden infectar y destruir células tumorales⁽³⁾. La mayoría de VOs seleccionados como agentes oncoterapéuticos son cepas atenuadas o cepas que pueden replicar y diseminarse en el microambiente tumoral sin generar enfermedades graves en humanos⁽⁴⁾.

El virus de la enfermedad de Newcastle (vENC) ha sido explorado desde 1965 como agente oncolítico^(5, 6) debido a su capacidad de destruir selectivamente células tumorales sin causar daños en las células normales⁽⁷⁾. El vENC es un virus de ácido ribonucleico (ARN) de sentido negativo, no segmentado, que pertenece al serotipo 1 de los paramixovirus aviares, al género avulavirus, y a la familia *paramixoviridae*. Las proteínas del vENC cumplen un rol clave en algunos mecanismos antineoplásicos del virus. Por ejemplo, se ha determinado que la proteína F de vENC es vital para la propagación del virus en los tumores⁽⁸⁾.

El vENC es un virus altamente infeccioso en aves, que causa pérdidas a gran escala en el sector avícola. Según su patogenicidad, se clasifica en: cepas lentogénicas (no virulentas), mesogénicas (intermedias) y velogénicas (virulentas). Un vENC recombinante fue generado y nombrado como rLS1. Esta cepa construida y sintetizada genéticamente *in vitro*, mostró características de una cepa lentogénica⁽⁹⁾. Por otro lado, el papel oncolítico de este constructo viral sobre líneas celulares de cáncer de próstata y de riñón aún no ha sido evaluado. Por lo que, resulta pertinente evaluar la capacidad oncolítica del rLS1 en diferentes líneas celulares tumorales debido a que podría convertirse en un terapéutico potencial.

Por este motivo, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar la actividad oncolítica del virus rLS1, mediante la reducción de la viabilidad celular y muerte celular por apoptosis en dos líneas tumorales de origen humano (*homo sapiens*): la línea celular de adenocarcinoma prostático (DU-145) y la línea celular de cáncer renal (786-O). Además, determinamos su selectividad replicativa viral sobre las líneas celulares tumorales y sobre una línea no tumoral de riñón canino Madin-Darby (MDCK).

MÉTODOS

Cultivos celulares

Las líneas celulares utilizadas en este estudio fueron obtenidas de American Type Culture Collection (ATCC). La línea celular de cáncer de próstata humano DU-145 (catálogo nro. HTB-81, ATCC, Rockville, MD, EE.UU), la línea celular de cáncer renal humano 786-O (catálogo nro. CRL-1932, ATCC, Manassas, VA, EE.UU), y la línea celular no tumoral Madin-Darby MDCK (catálogo nro. CCL-34, ATCC, Manassas, VA, EE.UU) fueron cultivadas con medio de cultivo de crecimiento compuesto por el medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (catálogo nro. SH30004.04, Hyclone, Logan, UT, EE.UU), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (catálogo nro. SH30066.03, Hyclone, ATCC, Manassas, VA, EE.UU). Las células de fibroblasto de pollo DF-1 (catálogo nro. CRL-12203, ATCC, Manassas, VA, EE.UU) fueron cultivadas con medio de cultivo de crecimiento compuesto por DMEM suplementado con 5% de SFB. Todas las líneas celulares fueron cultivadas en condiciones de cultivo a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. En la etapa de infección viral, las líneas celulares fueron cultivadas con medio de cultivo de infección compuesto por DMEM suplementado con 2% de SFB y 5% de fluido alantoideo.

Virus y propagación viral

El virus recombinante rLS1 fue desarrollado previamente por Chumbe *et al.*⁽⁹⁾ basándose en la secuencia de nucleótidos del genoma de una cepa lentogénica del vENC y fue protegido bajo la patente pe-

ruana 001179-2014/DIN. El virus rLS1 fue proporcionado por los laboratorios de investigación y desarrollo de Farvet S.A.C. (Chincha - Perú). Para la amplificación y obtención del stock viral, los huevos embrionados de pollo libres de patógenos específicos de 9 días de edad (Charles River, Norwich, CT, EE.UU) fueron inoculados con el virus rLS1 a través de la cavidad alantoidea. Luego de 4 días de incubación a 37 °C, el fluido alantoideo fue recolectado, clarificado y filtrado. Finalmente fue alicuotado y almacenado a -80 °C hasta su uso. La titulación viral fue determinada mediante la prueba de hemaglutinación y por ensayo en placa en células DF-1, siguiendo el procedimiento anteriormente descrito⁽⁹⁾.

Cinética de replicación viral del rLS1 *in vitro*

Células DU-145 (1,5 × 10⁵ células por pocillo) y 786-O (1,2 × 10⁵ células por pocillo) fueron sembradas en placas de cultivo celular de 12 pocillos (catálogo nro. 712001, Nest, Wuxi, China) con medio de cultivo de crecimiento. Las células fueron infectadas con el rLS1 con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 en un medio de cultivo de infección, y fueron incubadas en condiciones de cultivo. A las 12, 24, 36, 48, 60, 72 y 84 horas post-infección (hpi) se recolectó el sobrenadante. Estas alícuotas se mantuvieron a -80 °C hasta su uso. El título viral de cada tiempo fue determinado por ensayo en placa en células DF-1, siguiendo el procedimiento anteriormente descrito⁽⁹⁾. Este ensayo fue realizado por triplicado en experimentos independientes.

Análisis de inmunofluorescencia indirecta

Células DU-145 (1 × 10⁵ células por pocillo) y 786-O (0,8 × 10⁵ células por pocillo) fueron sembradas en placas de 24 pocillos (catálogo nro. 702001, Nest, Wuxi, China). Las células fueron infectadas con el rLS1 con MOI de 0,01 en medio de cultivo de infección y mantenidas a 37 °C con 5% de CO₂. El ensayo de inmunofluorescencia fue realizado siguiendo el procedimiento anteriormente descrito⁽⁹⁾. A las 48 hpi, las células fueron fijadas con formaldehído al 4% en buffer fosfato salino de Dulbecco 1X (DPBS 1X) frío por 30 minutos (min), y permeabilizadas con tritón X-100 (catálogo nro. 648463, Merck, Darmstadt, Alemania) al 0,1% en DPBS 1X por 15 min. Las

células fueron incubadas con el antisuero policlonal de pollo anti vENC como anticuerpo primario (catálogo nro. 10100486, AVS Bio, Norwich, CT, EE.UU) (1:200) diluido en albúmina de suero bovino (BSA) (catálogo nro. A7030-500G, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU) al 5% en dpbs 1x por 1 hora. Posteriormente, se incubaron por 1 hora con el anticuerpo Goat Anti-Chicken IgY H&L Alexa Fluor® 488 (catálogo nro. Ab150169, Abcam, Cambridge, MA, EE.UU) (1:1000), diluido en BSA al 5% en DPBS 1X. Los núcleos celulares fueron teñidos con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (catálogo nro. Ab104139, Abcam, Cambridge, MA, EE.UU). Se realizaron 3 lavados con DPBS 1X en cada paso del procedimiento y todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente. Finalmente, los resultados fueron observados en el microscopio invertido de contraste de fase y fluorescencia Zeiss axio observer. a1 (Carl Zeiss, Jena, Alemania). Las imágenes fueron capturadas a un aumento de 400X y procesadas utilizando la cámara Axiocam MRc5 (Carl Zeiss, Jena, Alemania). Las fotografías fueron representadas con una barra de escala de 50 μ m.

Evaluación de la selectividad replicativa viral de rLS1

Mediante una lectura visual cualitativa y rápida, esta técnica intenta demostrar que el virus rLS1 infecta y replica selectivamente en las células tumorales, causando la pérdida de la propiedad de adherencia celular en un cultivo en monocapa *in vitro*, lo cual podría ser debido a un daño en la viabilidad de la célula producto de la infección.

Las células DU-145 ($0,1 \times 10^5$ células por pocillo), 786-O ($0,08 \times 10^5$ células por pocillo) o MDCK ($0,05 \times 10^5$ células por pocillo) fueron sembradas en placas de 96 pocillos (catálogo nro. 701001, Nest, China). Las células fueron infectadas con el virus rLS1 con las MOIS de 0,01, 0,1, 1, 10, y 20 en un medio de cultivo de infección, y mantenidas en condiciones de cultivo. A las 48 hpi, las células fueron fijadas con formaldehído al 4% por 15 min, lavadas 3 veces con DPBS 1X, y teñidas con cristal violeta al 2% por 10 min. Los lavados, la fijación y tinción de las placas se realizaron a temperatura ambiente y en movimientos de agitación utilizando el

equipo Rocking Platform Shaker (VWR®, Batavia, IL, EE.UU). Los resultados fueron determinados mediante la observación de ausencia y/o reducción de tinción en los pocillos infectados, en comparación con los pocillos no infectados usados como control negativo. Este ensayo fue realizado por triplicado en experimentos independientes.

Evaluación de la disminución de la viabilidad celular causada por el virus rLS1

El ensayo de selectividad replicativa anteriormente mencionado intenta mostrar la infección, replicación selectiva, y la pérdida de la propiedad de adherencia celular pero no confirma que exista un daño sobre la viabilidad celular. Para complementar este ensayo, evaluamos la disminución de la viabilidad celular causada por la infección del virus sobre las células tumorales adherentes y en suspensión, mediante un ensayo colorimétrico utilizando el reactivo de tetrazolio (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxifenil]-2-[4-sulfofenil]-2h-tetrazolio) (MTS) (catálogo nro. Ab197010, Abcam, EE.UU). El MTS es un ensayo cuantitativo que mide el porcentaje de células viables en función a la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial en células metabólicamente activas, en donde, la cantidad del producto de formazán obtenido es directamente proporcional al número de células vivas presentes en el cultivo⁽¹⁰⁾.

Las células DU-145 ($0,1 \times 10^5$ células por pocillo), 786-O ($0,08 \times 10^5$ células por pocillo) o MDCK ($0,05 \times 10^5$ células por pocillo) fueron sembradas en placas de 96 pocillos. Las células fueron infectadas con el rLS1 con MOIS de 0,1, 1, y 10 en el medio de cultivo de infección y mantenidas en condiciones de cultivo. A las 48 hpi, se adicionó el reactivo MTS en cada pocillo, según las recomendaciones del fabricante, y se incubó por 4 horas en condiciones de cultivo y oscuridad. Finalmente, la lectura de las absorbancias se realizó a una longitud de onda de 490 nm, utilizando el equipo de lector de placas (Bioteck, EE.UU). El porcentaje de viabilidad fue determinado en función al promedio calculado de la absorbancia de los pocillos del control negativo con respecto al promedio calculado de la absorbancia de los pocillos infectados. Este

ensayo se realizó por triplicado en experimentos independientes.

Detección de apoptosis con Annexin V/anxa5-pe/SYTOX Blue Dead Cell Stain

Las células DU-145 ($2,3 \times 10^6$ células por pocillo) y 786-O ($1,4 \times 10^6$ células por pocillo) fueron sembradas en frascos de cultivo celular de 75 cm² (catálogo nro. 708003, Nest, China) en medio de cultivo de crecimiento. Ambas células fueron infectadas con el rLS1 con MOI de 1 en medio de cultivo de infección y mantenidas en condiciones de cultivo. A las 48 hpi, se recolectó el sobrenadante (que contenía células suspendidas) en un tubo de 50 mL y las células adheridas en los frascos de cultivo fueron tripsinizadas. Las células tripsinizadas se transfirieron al tubo de 50 mL que contenía el sobrenadante, y fueron centrifugadas a 800 rcf por 10 min a 4°C. Posteriormente, 1×10^6 células fueron tratadas con 1 mL del buffer anexina V-PE 1X + Hepes (catálogo nro. 15630-106, Gibco, EE.UU) 0,1 M ph 7,2. La detección de apoptosis (temprana y tardía) fue determinada siguiendo las instrucciones del kit annexin V/ANXA5-PE (catálogo nro. Ab14154, Abcam, Reino Unido) y el marcaje de SYTOX Blue Dead Cell Stain (catálogo nro. S34857, Invitrogen, EE.UU), respectivamente.

Las fluorescencias de las células marcadas fueron detectadas utilizando un citómetro de flujo BD FACSCanto II Flow Cytometer (DB Biosciences, San José, CA, EE.UU). Los resultados se representaron en gráficos dot plots de dos parámetros (Annexin V/anxa5-pe y SYTOX Blue Dead Cell Stain), a través de los filtros PE y v450, respectivamente, y en porcentajes, interpretándose como células viables (Annexin V/anxa5-pe*/SYTOX Blue Dead Cell Stain*), células apoptóticas tempranas (Annexin v/anxa5-pe*/SYTOX Blue Dead Cell Stain*), células apoptóticas tardías (Annexin v/anxa5-pe*/ SYTOX Blue Dead Cell Stain*) y células necróticas (Annexin v/anxa5-pe+/ SYTOX Blue Dead Cell Stain*). El número de eventos adquiridos fue de 30 000. Este ensayo se realizó por triplicado en experimentos independientes.

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos fueron realizados en el programa Graphpad Prism

versión 8.0.1 (Graphpad Software INC., San Diego, CA, EE.UU). El análisis two-way ANOVA, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Sidak's fue utilizado para comparar la cinética de crecimiento de rLS1 sobre las células tumorales. El análisis two-way ANOVA, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, fue utilizado para comparar el porcentaje de viabilidad celular, apoptosis y necrosis del virus rLS1 sobre las células tumorales, en comparación con el control (células no infectadas). Todos los valores de los datos representan tres experimentos independientes y se expresan como media \pm desviación estándar (DE). Los asteriscos en las figuras indican valores de p (* p = 0,0171, ** p = 0,0028, *** p = 0,0002, **** p < 0,0001) que se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Caracterización biológica del virus rLS1

En la cinética de replicación viral, el virus rLS1 exhibió características de crecimiento similares en ambas líneas tumorales. Sin embargo, el virus rLS1 mostró un título significativamente más bajo en las células DU-145 ($1,42E+04 \pm 3,8E+03$), en comparación con las células 786-O ($1,97E+05 \pm 9,44E+05$) (**** p < 0,0001) a las 48 hpi (Figura 1A). Adicionalmente, el ensayo de inmunofluorescencia indirecta confirmó la expresión de las proteínas del virus rLS1 al replicar en ambas líneas tumorales a las 48 hpi. Como era de esperar no se detectó la expresión de proteínas del virus en las células no infectadas (control) (Figura 1B).

Selectividad replicativa viral de rLS1

Se observó la ausencia de la tinción por cristal violeta en las células DU-145 infectadas con la MOI 1, 10 y 20. Por otro lado, en las células 786-O se observaron resultados similares, además, con la MOI 0,1, se observó una tinción parcial, lo cual podría indicar que esta línea presentó mayor sensibilidad a diferencia de las células DU-145. Por lo contrario, en la línea celular MDCK no se observó ausencia y/o reducción de tinción en ninguno de los pocillos infectados (Figura 2).

El rLS1 reduce la viabilidad celular en las líneas tumorales

Mediante el ensayo MTS se demostró que el virus rLS1 redujo significativamente

la viabilidad de las células tumorales DU-145 y 786-O de manera dependiente de la MOI usada.

La viabilidad de las células DU-145 disminuyó significativamente (**** p < 0,0001) hasta el $45,3\% \pm 6,1\%$ y $31,2\% \pm 8,1\%$ usando las MOIs de 1 y 10, respectivamente, mientras que, con la MOI de 0,1 hubo una reducción no significativa hasta $87,9\% \pm 1,8\%$ (p = 0,0606) en com-

paración con el control de células no infectadas (consideradas como $100\% \pm 0\%$ de viabilidad celular). Además, se demostró una reducción significativa (**** p < 0,0001) del porcentaje de viabilidad celular con la MOI 1 ($45,3\% \pm 6,1\%$) y 10 ($31,2\% \pm 8,1\%$) comparado a la MOI 0,1 ($87,9\% \pm 1,8\%$) (Figura 3).

La viabilidad de las células 786-O se redujo significativamente hasta $79,5\% \pm 3,1\%$

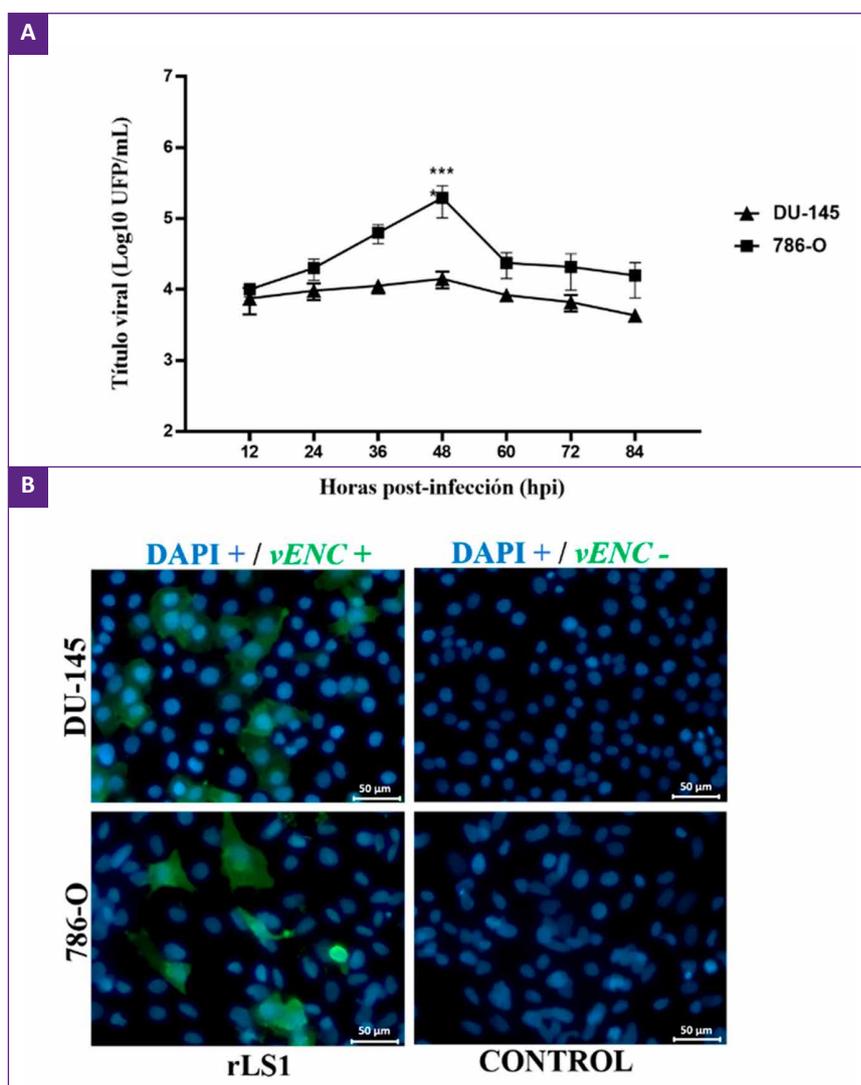


Figura 1. Caracterización biológica del constructo viral rLS1 *in vitro*. **A.** Cinética de replicación del virus rLS1 en las células DU-145 y 786-O. Ambas líneas fueron sembradas e infectadas con una MOI de 0,1. Los sobrenadantes fueron recolectados a las 12, 24, 36, 48, 60, 72 y 84 horas post-infección (hpi), y posteriormente, fueron titulados por ensayo en placa. Cada punto representa la media y desviación estándar (DE) de los títulos del virus rLS1 de tres experimentos independientes. Los títulos virales fueron analizados mediante el análisis two-way ANOVA, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Sidak's. **B.** Detección de la expresión de las proteínas del virus rLS1 por ensayo de inmunofluorescencia indirecta. Imagen representativa que muestra la expresión de las proteínas del vENC en las células DU-145 y 786-O, infectadas con una MOI de 0,01. La inmunotinción fue realizada utilizando un anticuerpo específico, los núcleos se tiñeron con DAPI y fueron visualizados utilizando un microscopio de fluorescencia Zeiss Axio Observer.

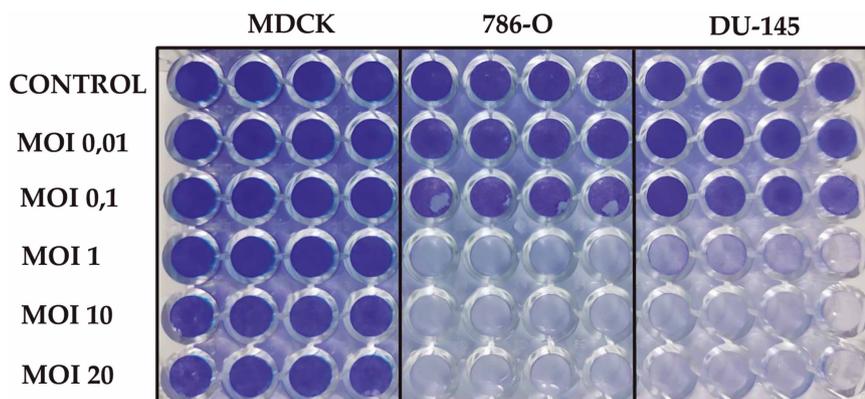


Figura 2. Selectividad replicativa viral de rLS1. Las líneas de células tumorales DU-145, 786-O y la línea celular no tumoral MDCK, se sembraron en placas de cultivo celular de 96 pocillos. Todas las líneas celulares fueron infectadas con diferentes MOIs: 0,01, 0,1, 1, 10 y 20. A las 48 hpi, las placas fueron fijadas y teñidas con paraformaldehído y cristal violeta, respectivamente. Se determinó la selectividad replicativa en base a la adherencia de células viables y se observó la ausencia y/o parcial tinción en los pocillos infectados con el virus rLS1 sobre las líneas celulares tumorales. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos realizados de forma independiente.

El constructo viral rLS1 induce apoptosis en células tumorales

El virus rLS1 indujo apoptosis (temprana/tardía) y necrosis en ambas líneas tumorales. En las células DU-145 hubo diferencia significativa ($****p < 0,0001$) en el porcentaje de células viables entre los grupos de células no infectadas ($83,3\% \pm 0,6\%$) y células infectadas con la MOI 1 ($53,7\% \pm 6,0\%$) a las 48 hpi. Asimismo, se observó diferencia significativa ($**p = 0,0028$) en el porcentaje de células apoptóticas entre los grupos de células no infectadas ($6,6\% \pm 1,5\%$) y células infectadas con la MOI 1 ($19,5\% \pm 4,1\%$). Adicionalmente, no hubo diferencia significativa en el porcentaje de células necróticas entre los grupos de las células no infectadas ($3,5\% \pm 2,5\%$) y células infectadas con la MOI 1 ($7,3\% \pm 10,4\%$) (Figura 4).

con una MOI de 0,1 ($***p = 0,0002$), mientras que con una MOI de 1 y 10 la viabilidad celular se redujo significativamente ($****p < 0,0001$) hasta $17,7\% \pm 7,5\%$ y $13,9\% \pm 4,8\%$, respectivamente, en comparación con el control ($100\% \pm 0\%$). Asimismo, se observó una reducción significativa ($****p < 0,0001$) de la viabilidad celular entre los diferentes tratamientos de infección con la MOI 1 ($17,7\% \pm 7,5\%$) y 10 ($13,9\% \pm 4,8\%$) en comparación con la MOI 0,1 ($79,5\% \pm$

$3,1\%$). Adicionalmente, se observó una diferencia significativa entre la MOI 1 ($17,7\% \pm 7,5\%$) y 10 ($13,9\% \pm 4,8\%$) ($*p = 0,0171$) (Figura 3).

En la línea celular no tumoral MDCK, no hubo una disminución significativa de la viabilidad celular con la MOI 0,1 ($92,7\% \pm 3,7\%$) ($p = 0,6208$), MOI 1 ($89,6\% \pm 1,2\%$) ($p = 0,1677$), y MOI 10 ($87,7\% \pm 1,9\%$) ($p = 0,0557$), en comparación con el control ($100\% \pm 0\%$) (Figura 3).

De igual manera, en la línea tumoral 786-O hubo diferencia significativa ($****p < 0,0001$) en el porcentaje de células viables entre los grupos de células no infectadas ($80,9\% \pm 1,2\%$) y células infectadas con la MOI 1 ($41,2\% \pm 4,2\%$) a las 48 hpi. Del mismo modo, se demostró diferencia significativa ($***p = 0,0002$) en el porcentaje de células apoptóticas, entre células no infectadas ($9,0\% \pm 1,0\%$) y células infectadas con la MOI 1 ($25,4\% \pm 2,5\%$). Por otro lado, no se observó di-

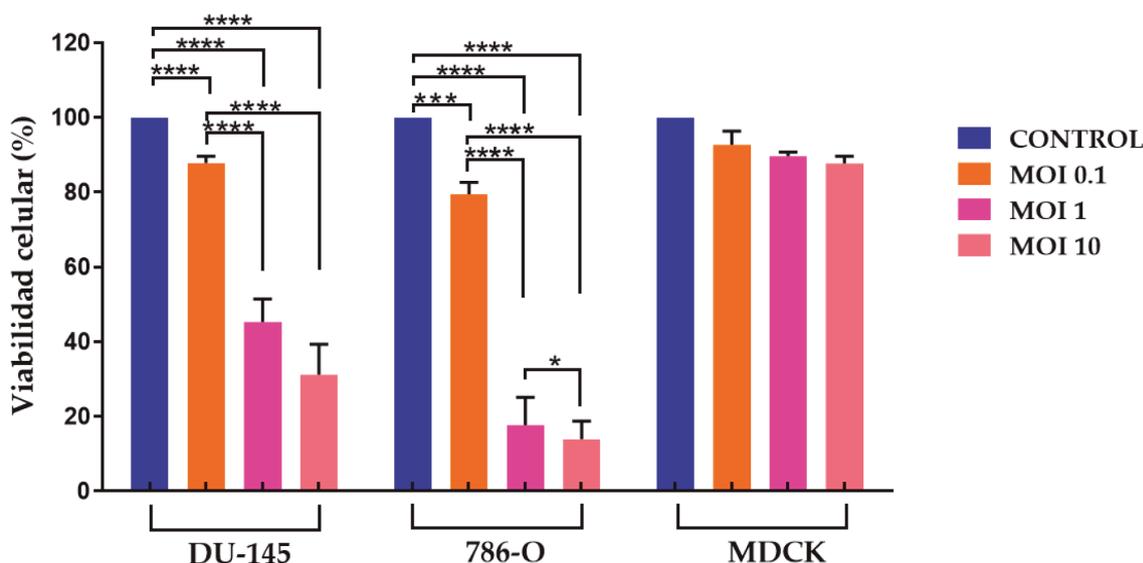


Figura 3. Reducción de viabilidad celular causada por el virus rLS1 en células DU-145, 786-O y MDCK evaluada por ensayo MTS. Las líneas celulares DU-145, 786-O y MDCK fueron sembradas e infectadas con diferentes MOI: 0,1, 1 y 10 por 48 horas. La reducción de la viabilidad celular causada por el virus rLS1 se determinó mediante un ensayo MTS y los resultados fueron expresados como la media \pm DE del porcentaje de viabilidad celular de tres experimentos independientes. ($****p < 0,0001$), ($***p = 0,0002$), ($*p = 0,0171$).

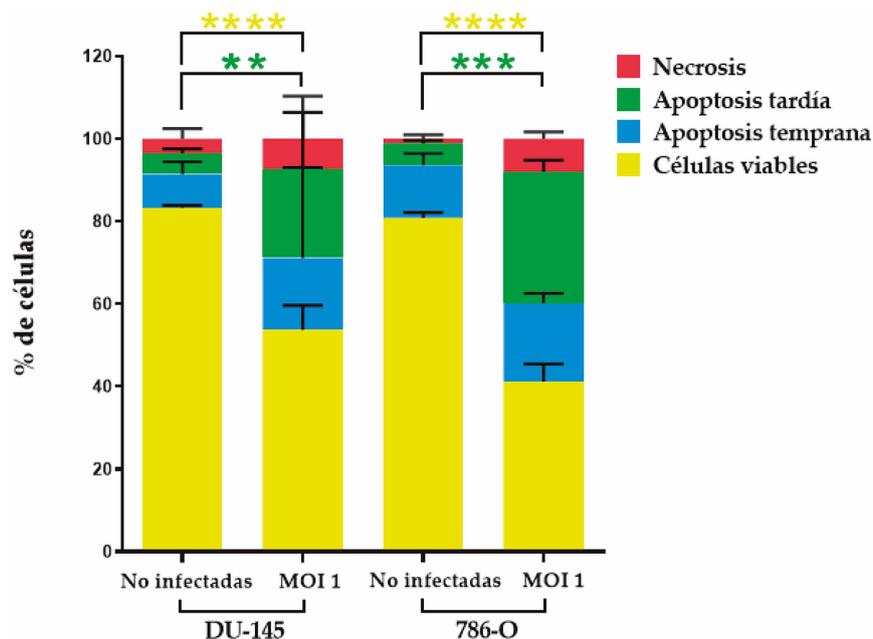


Figura 4. Porcentaje de células viables, apoptóticas (temprana y tardía) y necróticas, analizadas por citometría de flujo utilizando Annexin V/ANXA5-PE y SYTOX™ Blue Dead Cell Stain. Células DU-145 y 786-O, después de haber sido infectadas con el virus rLS1 con la MOI de 1 a las 48 hpi, fueron analizadas por citometría de flujo, utilizando dos marcadores fluorescentes Annexin v/Anxa5-pe y SYTOX Blue Dead Cell Stain. Células no infectadas fueron utilizadas como control. Los datos están representados como el promedio \pm DE de tres experimentos independientes, **** $p < 0,0001$, *** $p = 0,0002$, ** $p < 0,0028$ mediante two-way ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

ferencia significativa en el porcentaje de células necróticas, alcanzando el $1,2\% \pm 1,0\%$ en células no infectadas y $8,0\% \pm 1,7\%$ en células infectadas con la MOI 1 (Figura 4).

Una interpretación gráfica en dotplot representativa del análisis de apoptosis (temprana y tardía) y necrosis es mostrada en la figura 5.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que el constructo viral rLS1 tiene actividad oncolítica sobre las células tumorales DU-145 y 786-O. Mediante el ensayo MTS, se demostró la disminución de la viabilidad en las células 786-O y DU-145 debido a la infección con el virus rLS1. Además, se comprobó que la disminución de la viabilidad celular es dependiente de la MOI utilizada, de esta manera, una mayor concentración viral intensifica la reducción de viabilidad celular en ambas líneas tumorales. De igual manera, otras investigaciones han demostrado que la infección con la cepa

LaSota del vENC reduce la viabilidad en las líneas celulares tumorales A549, U87MG, T98G, HUH7, MDA-MB-453, y MCF7. La infección viral provocó una reducción de la viabilidad celular por debajo del 44%, mientras que, las líneas celulares no tumorales HEK293, NB1RGB y RCR-1 alcanzaron una viabilidad del 84%, 73%, y 69%, respectivamente ⁽⁷⁾. Asimismo, Keshavarz *et al.* ⁽¹¹⁾ demostraron que la cepa LaSota reduce la viabilidad en la línea celular tumoral murina TC-1 (células de cáncer de cuello uterino), hasta 54% y 43% con una MOI de 20 y 40, respectivamente, comparado a las células no infectadas (control negativo), según el ensayo MTT ⁽¹¹⁾.

Se ha determinado que el vENC puede replicar hasta 10 000 veces más en ciertos tipos de células tumorales de forma selectiva, en comparación a algunas células no tumorales, donde su replicación y efecto citopático son limitados ⁽¹²⁾. Esto se debe a que las células neoplásicas presentan mutaciones que alteran la vía de señalización del interferón de tipo I, generando en ellas una mayor susceptibili-

dad a la replicación viral ⁽¹³⁾.

En este estudio, se evaluó la selectividad de replicación viral en células tumorales mediante un ensayo *in vitro*. En ausencia de selectividad replicativa, las células adheridas al fondo del pocillo fueron teñidas con cristal violeta. Por el contrario, cuando hubo replicación viral selectiva, las células perdieron su adherencia y no se observó tinción. De este modo, se evidenció que las MOIs evaluadas no mostraron selectividad replicativa en la línea celular no tumoral MDCK, a diferencia de las células tumorales DU-145 y 786-O, donde se observó ausencia de tinción en los pocillos infectados a partir de la MOI 1. Además, el ensayo de selectividad replicativa con cristal violeta mostró que la infección y replicación del rLS1 causó la pérdida de la adherencia celular en las células tumorales en un cultivo *in vitro*.

Por otro lado, el ensayo MTS mostró una reducción en la viabilidad celular tras la infección viral. Esto sugiere que la pérdida de adherencia celular podría estar relacionada con la disminución de la viabilidad, como consecuencia de la replicación viral.

Se ha determinado que la evasión de las vías apoptóticas es una de las principales causas del desarrollo y supervivencia de las células tumorales. Asimismo, estudios previos han señalado que el vENC puede inducir apoptosis como uno de sus principales mecanismos para destruir las células tumorales ⁽¹⁴⁾. En este estudio, se demostró la capacidad del virus rLS1 de inducir significativamente apoptosis sobre las células tumorales DU-145 y 786-O mediante el análisis de translocación de la fosfatidilserina, utilizando el doble marcaje de Annexin V/ANXA5-PE y SYTOX™ Blue Dead Cell Stain, con un porcentaje de apoptosis (tempranas y tardías) de $19,5\% \pm 4,1\%$ en las células DU-145 y $25,4\% \pm 2,5\%$ en las células 786-O, confirmando así, que el rLS1 induce muerte celular por apoptosis en líneas celulares tumorales.

Kalantari *et al.* ⁽¹⁴⁾ demostraron que la cepa Lasota induce significativamente apoptosis temprana y tardía sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7, en comparación con el grupo control no infectado.

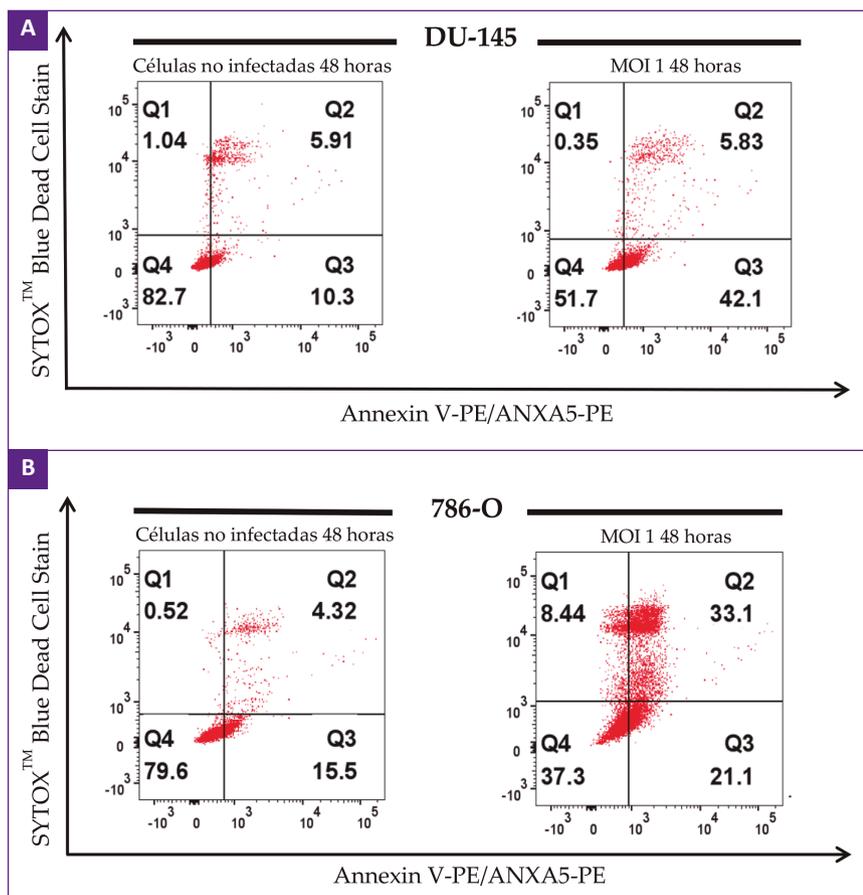


Figura 5. Interpretaciones gráficas dotplot representativas de apoptosis (temprana y tardía) y necrosis, analizadas por citometría de flujo utilizando Annexin V/ANXA5-PE y SYTOX™ Blue Dead Cell Stain. **A.** Células DU-145. **B.** Células 786-O, ambas líneas de células tumorales fueron infectadas con el virus rLS1 con una MOI de 1 y analizadas a las 48 hpi. Células no infectadas fueron utilizadas como control. Cada panel de la gráfica se interpretó de la siguiente manera; Q1: células necróticas (Annexin V/anxa5-pe-/SYTOX™ Blue Dead Cell Stain+); Q2: células apoptóticas tardías (Annexin V/ANXA5-PE+/SYTOX™ Blue Dead Cell Stain+); Q3: células con apoptosis temprana (Annexin V/ANXA5-PE+/SYTOX™ Blue Dead Cell Stain-) y Q4: células viables (Annexin V/ANXA5-PE-/SYTOX™ Blue Dead Cell Stain-). El número total de eventos adquiridos fue de 30 000. Este ensayo se realizó por triplicado en experimentos independientes.

Además, observaron un incremento en los niveles de expresión de genes relacionados con la apoptosis, como Bax, Caspasa-3 y Caspasa-9, evidenciando el efecto antitumoral del vENC a través de vías apoptóticas⁽¹⁵⁾. De manera similar, se ha reportado que la cepa NDV/HK84 induce apoptosis en células de adenocarcinoma hepático humano SK-HEP-1 HCC, según el ensayo de tinción con anexina V/FITC. En este estudio, la apoptosis tardía alcanzó un 67,27% en comparación con el 5,41% del control tratado con PBS. Además, se evaluó el efecto oncolítico de distintas cepas de vENC sobre las células tumorales SK-HEP-1 HCC, destacando la capacidad de inducción apoptótica de la cepa NDV/HK84⁽¹⁶⁾.

El vENC es considerado un virus con potencial oncolítico para futuros ensayos clínicos, ya que además de su selectiva replicación sobre células tumorales, es un virus patógeno específico de las aves, de manera que los efectos secundarios en humanos están limitados a síntomas de gripe y aparición de conjuntivitis de corta duración⁽¹⁷⁾. Asimismo, se ha identificado que el vENC recombinante es un vector eficaz para llevar genes foráneos⁽¹⁸⁾, como inductores de apoptosis o proteínas que incrementen la respuesta inmune tumoral^(19, 20), o para actuar específicamente en ciertos tipos de cáncer⁽²¹⁾. Actualmente, se están realizando cada vez más investigaciones con el vENC recombinante para transportar

diferentes genes que ayuden a potenciar su actividad oncoterapéutica^(22,23).

Las limitaciones de este estudio se encontraron en la evaluación de la selectividad replicativa viral y en el ensayo de MTS, donde se utilizó únicamente la línea no tumoral de riñón canino MDCK como control, aunque otros investigadores han utilizado un modelo de estudio similar para demostrar que el vENC tiene un potencial oncolítico selectivo sobre líneas tumorales sin ocasionar daño en una línea no tumoral^(19,24). Es recomendable complementar estos ensayos utilizando otras líneas tumorales y no tumorales humanas, ya que se ha demostrado que el grado de actividad oncolítica del virus podría depender del tipo de línea celular.

Concluimos que el virus rLS1 replica satisfactoriamente en las líneas de células tumorales DU-145 y 786-O, y tiene la capacidad de replicar selectivamente sobre ambas líneas tumorales sin causar daño en las células no tumorales MDCK. Finalmente, se demostró que el constructo viral rLS1 causa la disminución de la viabilidad celular e induce apoptosis en las células de cáncer DU-145 y 786-O. Creemos que el rLS1 podría convertirse en una alternativa terapéutica contra el cáncer de próstata y cáncer de riñón humano.

AGRADECIMIENTOS

A Ángela Montalván Ávalos de FARVET S.A.C. por su asistencia técnica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. The Global Cancer Observatory. International Agency for Research on Cancer. Globocan 2022. World Health Organization. Peru. [Internet]. [Fecha de acceso: 19 de diciembre de 2024]. Disponible en: <https://gco.iarc.who.int/today/en>
2. 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. DOI: 10.1186/s40425-018-0458-z
3. Russell SJ, Peng KW, Bell JC. Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol*. 2016; 176(1):139–48. DOI: 10.1038/nbt.2287
4. Lawler SE, Speranza MC, Cho CF, Chiocca EA. Oncolytic viruses in cancer treatment a review. *Jama Oncol*. 2017; 3(6):841–9. DOI: 10.1001/jamaoncol.2016.2064

5. Sinkovics JG, Horvath JC. Newcastle disease virus (NDV): brief history of its oncolytic strains. *J Clin Virol.* 2000; 16(1):1–15. DOI: 10.1016/s1386-6532(99)00072-4
6. Cassel WA, Garrett RE. Newcastle disease virus as an antineoplastic agent. *Cancer.* 1965; 18(7):863–8. DOI:10.1002/1097-0142(196507)18:7%3c863::aid-cnrcr2820180714%3e3.0.co;2-v
7. Ginting T, Suryatenggara J, Christian S, Mathew G. Proinflammatory response induced by newcastle disease virus in tumor and normal cells. *Oncolytic Virother.* 2017; 6:21–30. DOI: 10.2147/ov.s123292
8. Peeters B, Leeuw O, Koch G, Gielkens A. 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. DOI: 10.1128/jvi.73.6.5001-5009.1999
9. Chumbe A, Izquierdo-Lara R, Calderón K, Fernández-Díaz M, Vakharia V. Development of a novel newcastle disease virus (NDV) neutralization test based on recombinant NDV expressing enhanced green fluorescent protein. *Virology.* 2017; 14, 1–11. DOI:10.1186/s12985-017-0900-8
10. Mccauley J, Zivanovic A, Skropeta D. Bioassays for anticancer activities. *Methods Mol Biol.* 2013;1055:191-205. DOI: 10.1007/978-1-62703-577-4_14.
11. Keshavarz M, Nejad Asm, Esghaei M, Bokharaei-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; 1:27(1):47–52. DOI: 10.1016/j.sjbs.2019.04.015
12. Reichard K, Lorence R, Cascino C, Peeples M, Walter R, Fernando M, *et al.* Newcastle disease virus selectively kills human tumor cells. *J Surg Res.* 1992; 52(5):448-53. DOI: 10.1016/0022-4804(92)90310-v
13. Platanias I. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5(5):375–86. DOI: 10.1038/nri1604
14. Elankumaran S, Rockemann D, Samal S. Newcastle disease virus exerts oncolysis by both intrinsic and extrinsic caspase-dependent pathways of cell death. *J Virol.* 2006; 80(15):7522–34. DOI: 10.1128/jvi.00241-06
15. 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; 75(3):367–76. DOI: 10.22092/ari.2019.125824.1322
16. Chen L, Niu Y, Sun J, Lin H, Liang G, Xiao M, *et al.* Oncolytic activity of wild-type Newcastle disease virus HK84 against hepatocellular carcinoma associated with activation of type I interferon signaling. *J Clin Transl Hepatol.* 2022; 28;10(2):284-296. DOI: 10.14218/jcth.2021.00284
17. Pecora A, Rizvi N, Cohen G, Meropol N, Sterman D, Marshall J, *et al.* Phase I trial of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, in patients with advanced solid cancers. *J Clin Oncol.* 2002; 1;20(9):2251–66. DOI: 10.1200/jco.2002.08.042
18. 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. DOI: 10.1371/journal.pone.0164723
19. Syed Najmuddin S, Amin Z, Tan S, Yeap S, 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. *Peer j.* 2020; 8;8. DOI: 10.7717/peerj.9761
20. Mohamed Z, Che Ani M, Tan S, Yeap S, Alitheen N, Syed Najmuddin S, *et al.* Evaluation of a recombinant Newcastle disease virus expressing human IL12 against human breast cancer. *Sci rep.* 2019;9(1):13999. DOI: 10.1038/s41598-019-50222-z
21. Shobana R, Samal S, Elankumaran S. Prostate-specific antigen-retargeted recombinant Newcastle disease virus for prostate cancer virotherapy. *J virol.* 2013; 87(7):3792-800. DOI: 10.1128/jvi.02394-12
22. Wu Y, Zhang X, Wang X, Wang L, Hu S, Liu X, *et al.* Apoptin enhances the oncolytic properties of newcastle disease virus. *Intervirol.* 2012; 55(4):276–86. DOI: 10.1159/000328325
23. Zamarin D, Martínez-Sobrido L, Kelly K, Mansour M, Sheng G, Vigil A, *et al.* Enhancement of oncolytic properties of recombinant Newcastle disease virus through antagonism of cellular innate immune responses. *Mol ther.* 2009; 17(4):697–706. DOI: 10.1038/mt.2008.286
24. Al-Ziaydi A, Al-Shammari A, Hamzah M, Kadhim H, Jabir M. Newcastle disease virus suppress glycolysis pathway and induce breast cancer cells death. *Virusdisease.* 2020; 31(3):341-348. DOI: 10.1007/s13337-020-00612-z.