



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“EFECTO ONCOLÍTICO DEL VIRUS DE NEWCASTLE EN UN  
MODELO CANINO DE LINFOMA ESPONTÁNEO”**

**TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:  
DIANA SÁNCHEZ CASTRO**

**TUTOR PRINCIPAL:  
LUIS ALBERTO MEDINA VELÁZQUEZ – INSTITUTO DE FÍSICA, UNAM  
COMITÉ TUTOR:  
ROSA ELENA SARMIENTO SILVA – FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA  
Y ZOOTECNIA, UNAM,  
GABRIELA NORA CESARMAN-MAUS – INSTITUTO NACIONAL DE  
CANCEROLOGÍA, SSA**

**CIUDAD DE MÉXICO**

**JULIO**

**2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó bajo la dirección de los Doctores: Luis A. Medina Velázquez, Rosa Elena Sarmiento Silva y Gabriela Nora Cesarman-Maus. Además se contó con la colaboración de la Dra. Rosana Pelayo y la participación del Dr. Luis Núñez Ochoa.

El desarrollo experimental se llevó a cabo en las siguientes instituciones: Departamento de Microbiología e Inmunología y Departamento de Pequeñas Especies, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia - UNAM; Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del Centro Médico Nacional s. XXI - IMSS; Departamento de Patología del Hospital Español y en el Departamento de Medicina Nuclear del Instituto Nacional de Cancerología.

Durante el desarrollo del Proyecto de Investigación se contó con el apoyo económico del consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (beca CONACYT 447819).

## AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a las siguientes instituciones y autoridades académicas, quienes fueron soporte durante mis estudios de Doctorado y del presente proyecto de investigación:

Universidad Nacional Autónoma de México

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Instituto Nacional de Cancerología

Instituto Mexicano del Seguro Social

Hospital Español

Federación Canófila Mexicana

Dr. Luis Alberto Medina Velázquez

Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva

Dra. Gabriela Cesarman-Maus

Dra. Rosana Pelayo Camacho

Dra. Hortensia Corona Monjaras

Dra. Yukie Tachika Ohara

Dra. Alejandra Zárate Osorno

Dr. Enrique Estrada Lobato

Dr. Osvaldo García-Pérez

Dr. Jesús Andrés Villalobos Díaz

## RESUMEN

La investigación sobre virus oncolíticos se ha enfocado principalmente al tratamiento de tumores sólidos, con poca información referente a su actividad en neoplasias hematológicas. También se ha dirigido hacia el tratamiento en humanos, aunque podría ser de utilidad en animales. Varias cepas del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) se han empleado como oncolíticos *in vitro* e *in vivo*. En este trabajo se estudió el efecto citolítico de una cepa lentogénica del NDV (NDV-MLS) sobre células de linfoma B humano (SU-DHL-4), así como en cultivos celulares primarios de linfoma B canino. El efecto se comparó con aquel observado en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de humanos y perros sanos. El NDV-MLS redujo la supervivencia de las células cancerosas humanas ( $42\% \pm 5\%$ ) y de perro ( $34\% \pm 12\%$ ), en comparación con los controles no tratados. No se observó un efecto significativo sobre las PBMC. La infección *in vivo* de células linfoides malignas de perro por el NDV-MLS se confirmó por microscopía electrónica. La biodistribución temprana (24h) posterior la inyección intravenosa de  $1 \times 10^{12}$  TCID<sub>50</sub> (dosis infecciosa en cultivo tisular) en un perro con linfoma de células T mostró diseminación viral sólo en el riñón, glándula salival, pulmón y estómago, por inmunohistoquímica y/o PCR punto final. Concluimos que NDV-MLS puede ser un agente prometedor para el tratamiento de los linfomas. Se necesitan investigaciones adicionales para dilucidar el régimen terapéutico óptimo y establecer medidas de bioseguridad adecuadas.

Palabras clave: Newcastle, oncolítico, linfoma.

## ABSTRACT

Research on oncolytic viruses has mostly been directed towards the treatment of solid tumors, which has yielded limited information regarding their activity in hematological cancer. It has also been directed towards the treatment of humans, yet veterinary medicine may also benefit. Several strains of the Newcastle disease virus (NDV) have been used as oncolytics *in vitro* and in a number of *in vivo* experiments. We studied the cytolytic effect of NDV-MLS, a low virulence strain, on a human large B-cell lymphoma cell line (SU-DHL-4), as well as on primary canine-derived B-cell lymphoma cells, and compared them to healthy peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from both humans and dogs. NDV-MLS reduced cell survival in both human ( $42\% \pm 5\%$ ) and dog ( $34\% \pm 12\%$ ) lymphoma cells as compared to untreated controls. No significant effect on PBMC was seen. NDV-MLS infections of malignant lymphoma tumors *in vivo* in dogs were confirmed by electron microscopy. Early (24 h) biodistribution of intravenous injection of  $1 \times 10^{12}$  TCID<sub>50</sub> (tissue culture infective dose) in a dog with T-cell lymphoma showed viral localization only in the kidney, the salivary gland, the lung and the stomach by immunohistochemistry and/or endpoint PCR. We conclude that NDV-MLS may be a promising agent for the treatment of lymphomas. Future research is needed to elucidate the optimal therapeutic regimen and establish appropriate biosafety measures.

Keywords: Newcastle, oncolytic, lymphoma

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	8
MARCO TEÓRICO.....	8
Neoplasias hematológicas malignas .....	8
Cáncer: un problema importante de salud humana y animal .....	9
El perro como modelo espontáneo preclínico oncológico.....	11
Perspectivas actuales en el tratamiento de los linfomas.....	12
Virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) .....	13
Mecanismos de selectividad oncolítica del NDV .....	16
Potencial oncolítico del NDV a nivel preclínico.....	17
Potencial del NDV a nivel clínico .....	22
La Tomografía por Emisión de Positrones/Tomografía computarizada (PET/CT) como herramienta en la investigación preclínica oncológica .....	24
JUSTIFICACIÓN.....	26
OBJETIVO GENERAL .....	27
Objetivos específicos.....	27
HIPÓTESIS .....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
Células y condiciones de cultivo .....	28
Virus de la Enfermedad de Newcastle.....	30
Experimentos de quimiosensibilidad y dosis-respuesta.....	31
Ensayo de citotoxicidad.....	33
Citometría de flujo .....	33
Distribución temprana selectiva del NDV-MLS en un modelo canino de enfermedad espontánea .....	34
Análisis pos-mortem de la biodistribución viral.....	35
Aislamiento de RNA y reacción en cadena de polimerasa-transcripción reversa (RT-PCR) .....	36
Estudios de PET/CT en perros sanos.....	38
Consideraciones éticas .....	39
Análisis estadístico .....	39
RESULTADOS.....	40
El NDV-MLS es capaz de matar selectivamente linfocitos malignos de origen humano y canino.....	42
Las células mononucleares de sangre periférica (MSP) son menos sensibles al efecto del NDV-MLS .....	43
Los linfocitos humanos sanos de estirpe B no son sensibles al efecto citotóxico del NDV-MLS .....	46
La biodistribución viral temprana en un perro con linfoma espontáneo no mostró ser extensa .....	47

Parámetros para la adquisición de imágenes PET/CT en perros sanos empleando $^{18}\text{F}$ FDG .....	49
DISCUSIÓN .....	50
CONCLUSIONES.....	54
REFERENCIAS .....	54
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	61
ABREVIATURAS Y SIGLAS.....	62



## INTRODUCCIÓN

Cáncer, es el nombre común para definir a un grupo de enfermedades que se originan de la proliferación continua y descontrolada de células anormales, con capacidad de invasión y destrucción de tejidos. El abordaje terapéutico de estas enfermedades depende, entre otros: del tipo de cáncer, las características clínicas del paciente e incluso la región del mundo en donde este se encuentre. La cirugía, radioterapia, quimioterapia y terapias dirigidas, han sido la base del tratamiento integral de estas enfermedades, aunque mostrando efectos tóxicos frecuentes y respuestas variables con cifras globales que reflejan un 40-50% de pacientes en recaída, con resistencia al tratamiento y que fallecen a causa de la enfermedad.

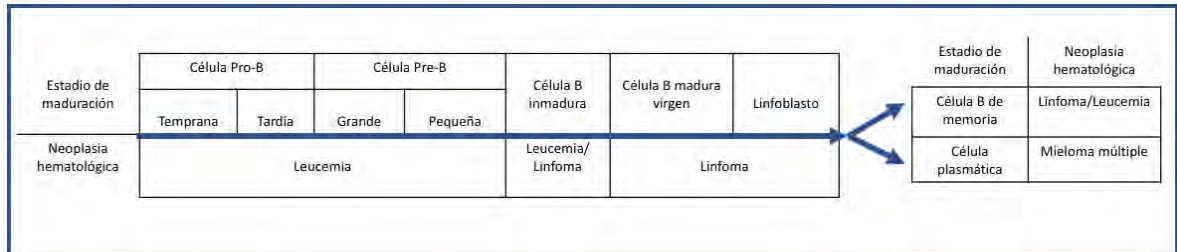
Incrementar el índice de curación y supervivencia de los pacientes con cáncer requiere un esfuerzo constante para lograr desarrollar tratamientos más eficaces, menos tóxicos y económicamente más accesibles.

## MARCO TEÓRICO

### Neoplasias hematológicas malignas

En función del tejido y célula de origen el cáncer se clasifica en: sarcomas, carcinomas y neoplasias hematológicas malignas. Este último grupo está conformado por más de 50 tipos y subtipos de linfomas, leucemias y mielomas, cada uno constituyendo una entidad clínica específica. Los linfomas o tumores de linfocitos representan un grupo de neoplasias monoclonales que se originan de los

linfocitos B, T o de las células asesinas naturales (NK por sus siglas en inglés) (Swerdlow, Campo, & Harris, 2008) (Figura 1).



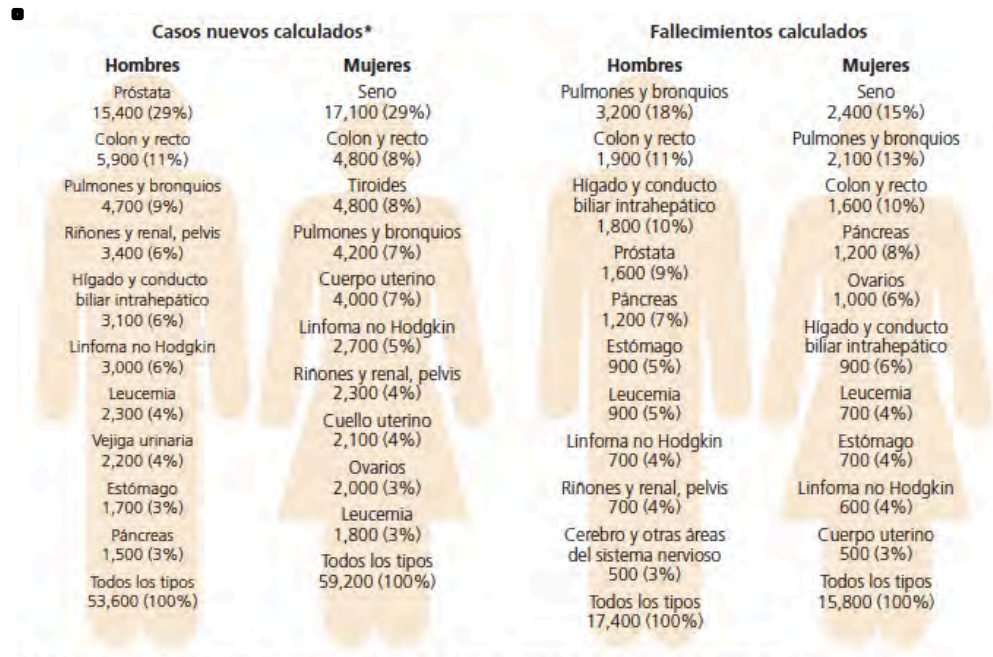
**Figura 1.** Neoplasias malignas con origen en el linfocito B. Representación esquemática de los estadios de diferenciación del linfocito B y la neoplasia hematológica a las que puede dar origen.

## Cáncer: un problema importante de salud humana y animal

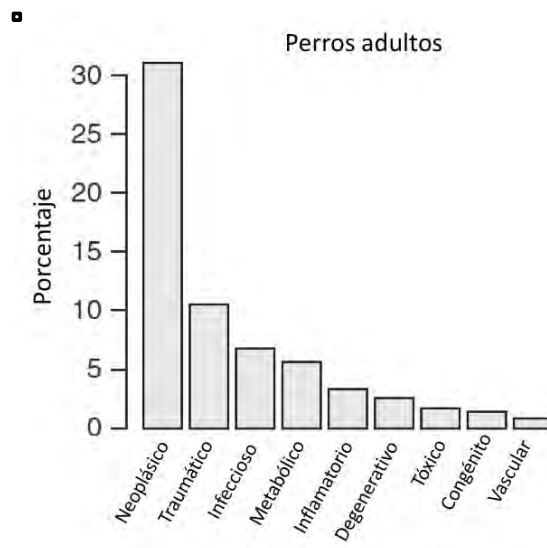
De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) el cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, con cifras alarmantes y crecientes. En 2012 se registraron 32.6 millones de personas con cáncer, 14.1 millones de casos nuevos y 8.2 millones de muertes por la enfermedad. Para el año 2030 se estima que las muertes por cáncer llegarán a más de 13.1 millones. Del total de casos de cáncer, las neoplasias hematológicas presentan una incidencia mundial del 11.63% (844,742 casos), entre los hispanos se aproxima al 9% (Figura 2), y en México es del 11.5% (Organization, 2014).

De manera similar a lo que ocurre en humanos, el cáncer en perros es un problema importante de salud (Casteleyn et al., 2013). En esta especie representa la principal causa de muerte entre los individuos adultos y las variantes más

frecuentes son: mastocitomas, sarcomas de tejido blando, osteosarcomas, linfomas y tumores de glándula mamaria (Fleming, Creevy, & Promislow, 2011) (Figura 3). Los linfomas comprenden del 7-14% del total de los tumores y del 83-90% de las neoplasias hematológicas en esta especie (Ito, Frantz, & Modiano, 2014; Vail, 2013).



**Figura 2.** Principales tipos de cáncer entre los hispanos, 2012. Casos nuevos de cáncer y causa de fallecimiento por sitio anatómico, cálculos para 2012. \*Se excluyen todos los cánceres de células basales y células escamosas de la piel y carcinomas *in situ*, excepto de la vejiga urinaria. Tomado de la Sociedad Americana contra el cáncer, Surveillance Research, 2012.



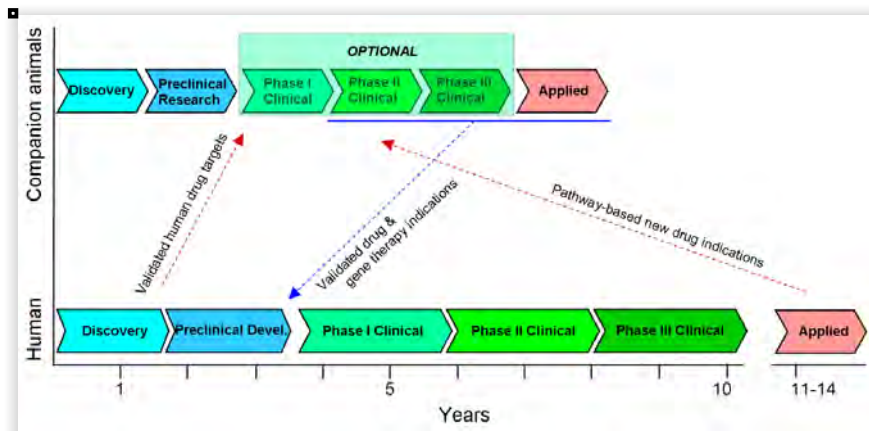
**Figura 3.** Porcentaje de muertes en perros adultos por proceso fisiopatológico. Entre 64, 697 perros adultos ( $\geq 1$  año), 23, 438 fueron clasificados por proceso patológico (Fleming J.M, et al, 2011).

### El perro como modelo espontáneo preclínico oncológico

El modelo de cáncer humano basado en ratón (modelos murinos) ha sido significativo en el estudio de los mecanismos moleculares del cáncer, sin embargo presenta un uso limitado para el desarrollo de nuevas terapias al no reflejar eficientemente las características biológicas de la enfermedad humana (Cekanova & Rathore, 2014).

Debido a que los perros desarrollan linfoma de forma natural y a que la enfermedad en ambas especies presenta similitudes histológicas, fenotípicas, biológicas y de respuesta a terapias convencionales, los perros han sido considerados un excelente modelo de estudio en la investigación preclínica

oncológica (Ostrander, 2012; Rowell, McCarthy, & Alvarez, 2011). Adicionalmente, este modelo ha mostrado la ventaja de disminuir los tiempos requeridos en el curso típico de la investigación y desarrollo de nuevos medicamentos (Rowell et al., 2011) (Figura 4).



**Figura 4.** Potencial traslacional del perro como modelo espontáneo de cáncer. La línea del tiempo inferior muestra el curso típico de la investigación y desarrollo de medicamentos para uso humano. Aunque el esquema sigue el mismo proceso en perros de compañía (línea de tiempo superior), el establecimiento opcional de las distintas fases clínicas de los ensayos, así como el menor tiempo de vida de esta especie comparado con el humano, permiten tiempos menores en el desarrollo de las investigaciones (Rowell et al., 2011).

### Perspectivas actuales en el tratamiento de los linfomas

El tratamiento de los linfomas en humanos y perros se ha basado de manera predominante en la aplicación de quimioterapia y radioterapia. En humanos, otras modalidades de tratamiento como las terapias dirigidas (por ejemplo: anticuerpos

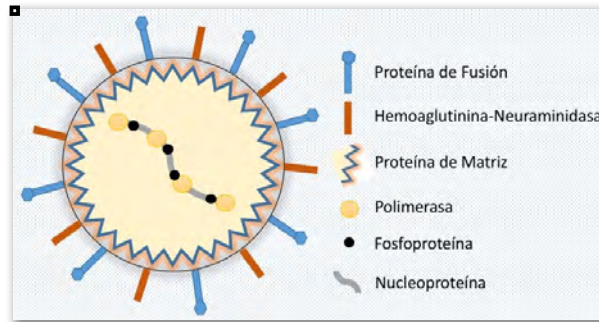
monoclonales) son ampliamente usadas en la actualidad (Board, 2002; D. Regan, Guth, Coy, & Dow, 2016). Sin embargo, a pesar de que los distintos tratamientos han mejorado la tasa de respuesta y supervivencia, siguen siendo frecuentes las recaídas, resistencias al tratamiento, efectos tóxicos adversos e incluso el desarrollo de neoplasias secundarias (Friedberg, 2011; MacDonald, Thamm, Kurzman, Turek, & Vail, 2005; Schaapveld et al., 2015).

Resultados alentadores recientes tanto a nivel preclínico como clínico, proponen a los *virus oncolíticos* como una herramienta potencial para el tratamiento del cáncer (Appleton et al., 2015; Shen, Patnaik, Ruiz, Russell, & Peng, 2016). Reconocidos desde hace 90 años (Bluming & Ziegler, 1971; Gross, 1971), estos virus han sido estudiados por su capacidad natural para matar células cancerosas, además de su facilidad para llevar a cabo modificaciones genéticas que les confieran esta habilidad o la mejoren (Eager & Nemunaitis, 2011; Lam et al., 2011; Wong, Lemoine, & Wang, 2010). El virus de Newcastle ha demostrado poseer una capacidad natural para matar a las células cancerosas de forma selectiva, asociado tanto a un efecto directo (debido a su replicación) como inmuno-estimulante (Zhao, Janke, Fournier, & Schirmacher, 2008).

### Virus de la enfermedad de Newcastle (NDV)

El NDV pertenece al género *Avulavirus* de la familia *Paramixoviridae*. Es un virus pleomórfico, de ácido ribonucleico (RNA), de una sola cadena con sentido negativo y un genoma de 15kb con 6 genes que codifican para 6 proteínas

estructurales: nucleoproteína (NP), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), proteína de fusión (F), hemoaglutinina-neuraminidasa (HN) y polimerasa (L) (Aldous & Alexander, 2001) (Figura 5).



**Figura 5.** Estructura del virus de Newcastle. Se muestran las 6 proteínas estructurales del NDV.

Los paramixovirus aviáres se clasifican en 10 serotipos. Corresponde al virus de Newcastle el serotipo I, por lo que también es conocido como paramixovirus aviar tipo I (APMV-I). Este virus fue descubierto en 1926 y es capaz de infectar a más de 250 especies de aves, siendo particularmente susceptibles las aves domésticas. De acuerdo a la patogenicidad observada en pollos, el virus ha sido clasificado en 3 patotipos: 1) cepas velogénicas o altamente virulentas; 2) cepas mesogénicas o moderadamente virulentas y 3) cepas lentogénicas o avirulentas. Las cepas de APMV-I también pueden ser agrupadas en dos clases, I y II, basado en la relación genética entre los virus. La mayoría de las cepas pertenecen a la clase II, que a su vez se divide en al menos ocho genotipos (Perozo, Merino, Afonso, Villegas, & Calderon, 2008).

La virulencia del NDV principalmente está determinada por la secuencia de aminoácidos en el sitio de escisión del precursor de la proteína de fusión (F). Las cepas altamente virulentas poseen múltiples aminoácidos básicos en este sitio, favoreciendo su ruptura por proteasas intracelulares ubicuas, que favorece la presentación de infecciones sistémicas. Las cepas lentogénicas al no poseer múltiples aminoácidos básicos en este sitio de corte, este sólo puede ser procesado por proteasas extracelulares tipo tripsina, que están confinadas al tracto respiratorio y digestivo (Panda, Huang, Elankumaran, Rockemann, & Samal, 2004).

Es importante mencionar que el virus se considera una zoonosis. En humanos está documentado el desarrollo de conjuntivitis posterior a las 24h del contacto ocular con el virus, siendo autolimitante y asociada principalmente a la exposición a cepas velogénicas. No se han reportado infecciones en otras especies de mamíferos y tampoco se ha encontrado evidencia de contagio humano-humano (Buijs et al., 2014).

Pese a que se ha reportado que el virus se transmiten fácilmente por fómites, también se sabe que es un virus sensible a: clorhexidina, hipoclorito de sodio (6%), fenoles, agentes oxidantes; así como al calor (se puede inactivar a 56°C durante 2h ó a 60°C durante 30 minutos), ácido (pH 3), éter y formol (eficacia del formol varía con la temperatura) (Geering, Penrith, & Nyakahuma, 2001). También se ha demostrado que el virus se inactiva posterior al contacto con: cloro, SDF<sup>TM</sup> o Virkon® (desinfectante formulado con ácidos orgánicos, peróxidos, surfactantes y amortiguador inorgánico estabilizado), de -23 °C - 10°C, durante 5 minutos (Guan, Chan, Brooks, & Rohonczy, 2014).



## Mecanismos de selectividad oncolítica del NDV

La replicación selectiva del virus de Newcastle en células cancerosas humanas, está dada principalmente por la pobre respuesta de estas células hacia interferón tipo I (principalmente  $\beta$ ), lo que ocasiona que las células no sean capaces de inducir una rápida y sostenida producción de proteínas antivirales (Fiola et al., 2006; Krishnamurthy, Takimoto, Scroggs, & Portner, 2006). La producción temprana de interferón tipo I es importante para la resistencia a la infección por el NDV (Wilden, Schirmmacher, & Fournier, 2011).

El gen inducible de ácido retinoico-I (RIG-I) también juega un rol importante en el reconocimiento y respuesta a la infección por virus RNA. Se ha reportado correlación entre el grado de resistencia de las células a la infección por el NDV y la expresión celular de este gen, y se ha demostrado que el deterioro de la vía de interferón (IFN) a través de la delección del receptor de IFN-I en macrófagos primarios, lleva a la replicación del virus (Fournier, Wilden, & Schirmmacher, 2012).

Entre la susceptibilidad a la infección por el NDV y la expresión basal de los genes antivirales RIG-I, IRF-3, IRF-7 e IFN- $\beta$ , se ha encontrado una correlación inversa. Cultivos primarios de macrófagos murinos son resistentes a la infección por el NDV y exhiben una expresión basal alta e inducible de estos genes antivirales, en tanto que macrófagos derivados de células tumorales son altamente susceptibles a la infección por el NDV y muestran baja expresión de estos genes antivirales. La fuerte expresión de estos genes podría explicar la resistencia de otras células normales a la infección viral y a una expresión débil la amplia susceptibilidad de las

células tumorales (Wilden, Fournier, Zawatzky, & Schirmmacher, 2009; Wilden et al., 2011).

Por otro lado esta selectividad también ha sido atribuida a la sobre-expresión en células cancerosas, de proteínas antiapoptóticas como Bcl-xL (proteína miembro de la familia de Bcl-2) (Mansour, Palese, & Zamarin, 2011). Células humanas de cáncer de pulmón de células no pequeñas (línea A549) muestran una respuesta incrementada a la apoptosis inducida por el virus de Newcastle, asociado a la sobre-expresión de esta proteína, aún cuando las células son capaces de montar una respuesta adecuada de IFN-I (Mansour et al., 2011).

## Potencial oncolítico del NDV a nivel preclínico

Diversos estudios han demostrado la capacidad del NDV para destruir células cancerosas. Destacan los hallazgos observados con las cepas que se mencionan a continuación.

- *NDV en Tumores sólidos.*
  1. F2240 (cepa de Malasia aislada en 1960), ha demostrado efecto oncolítico en cultivos celulares de: cáncer de mama (MCF) y cáncer de mama resistente a cisplatino (MCF-CR); en esta última línea celular, la susceptibilidad al virus se ha visto que disminuye conforme incrementa la expresión de survivina (proteína inhibidora de la apoptosis) (Jamal, Ch'ng, Yusoff, & Shafee, 2012).

Otros experimentos han demostrado su efecto apoptótico en líneas celulares humanas de carcinoma de colon (de tipo silvestre, así como en las HT29 y HCT116); efecto mediado tanto por Bax (proteína pro-apoptótica, miembro de la familia de Bcl-2), como independiente de ella (a través de vías mitocondriales) (Molouki & Yusoff, 2012). En una línea celular de astrocitoma anaplásico (U-87MG) se ha observado efecto pro-apoptótico dependiente de la concentración y del tiempo (Ali et al., 2011).

2. MTH-68/H (cepa vacunal) induce apoptosis selectiva (independiente de p53), en líneas celulares de: feocromocitoma de rata (PC12), glioblastoma (LNZTA3WT4) y adenocarcinoma de cérvix (HeLa) (Fabian, Csatory, Szeberenyi, & Csatory, 2007). Una variante de esta cepa, creada por ingeniería genética para expresar IgG, ha mostrado ser eficaz para matar células humanas de cáncer de colon (línea HT29) (Puhler et al., 2008).
3. UPI/93 (cepa velogénica) demostró su capacidad para inducir apoptosis en células de cáncer cérvico-uterino (HeLa) (Kumar et al., 2012).
4. Hitchner B1 y Ulster (cepas lentogénicas vacunales) han demostrado efecto oncolítico en diferentes líneas celulares humanas de cáncer de páncreas (Walter, Attar, Rafiq, Tejaswi, & Delimata, 2012). La cepa Hitcher B1 administrada intratumoral en un modelo ortotópico murino singénico de glioblastoma multiforme (GL261) prolongó la supervivencia media de los ratones, en los que además se observó elevada infiltración de células T positivas a IFN- $\gamma$  y acumulación reducida de células supresoras derivadas

mieloides (Koks et al., 2015). Una variante atenuada de la cepa Hitchner B1 (denominada HUU), ha demostrado ser capaz de matar células de cultivos primarios de melanomas quimio-resistentes; lo anterior, dependiente de la expresión de livina (proteína anti-apoptótica altamente expresada en este tipo de cáncer) (Lazar et al., 2010). HUU también ha demostrado efecto citopático selectivo *in vitro*, sobre un panel de células de cáncer de pulmón murinas y humanas (asociado a altos niveles de transcripción viral, traducción y ensamble de progenie viral), y disminución del desarrollo de tumores pulmonares primarios y metástasis en ratones (células murinas 3LL-D122), con la muerte preferencial de las células tumorales (Yaacov et al., 2008). Otra variante de la cepa Hitchner B1 (cepa denominada NDV(F3aa)-GFP), creada por ingeniería genética para mejorar sus propiedades fusogénicas, ha demostrado efecto oncolítico en cáncer de cabeza y cuello (Li et al., 2011). Esta última variante a su vez, ha sido modificada para expresar la proteína NS1 del virus de influenza (para mejorar las capacidades fusogénicas, antiapoptóticas y antagonista de IFN) con efecto oncolítico demostrado en modelos murinos de melanoma de ratón (Zamarin, Vigil, Kelly, Garcia-Sastre, & Fong, 2009).

5. D93 (aislado natural) ha mostrado efecto oncolítico en células de cáncer de pulmón (línea A549), al inducir apoptosis por vía dependiente de caspasas, además de reprimir la expresión de proteínas Bcl-2 (Fu et al., 2011).
6. Anhinga/Anh-EGFP (cepa creada por ingeniería genética que posee una inserción de proteína verde fluorescente mejorada) ha demostrado ser eficaz

para matar células de carcinoma hepatocelular *in vitro* y en modelos preclínicos *in vivo* (Wu et al., 2014).

7. D817 (aislado de China) a dosis moderada, administrada en la vena caudal a ratones desnudos con tumores subcutáneos de carcinoma de colon humano, inhibe el crecimiento de forma más eficaz comparado con 5 Fluorouracilo, incrementando además el índice de apoptosis e induciendo la producción de TNF-alfa (Huang et al., 2009).
8. Italien recombinante (rNDV-18HL) que codifica para la expresión de un anticuerpo contra el antígeno CD147 (cHAb18), demostró ser eficaz en inducir necrosis tumoral, reducir metástasis intrahepáticas y prolongar la supervivencia de ratones transplantados con carcinoma hepatocelular (Wei et al., 2015).
9. Cepa LaSota (cepa vacunal) ha mostrado efecto oncolítico en diferentes líneas de cáncer de páncreas (Walter et al., 2012). Una variante recombinante que produce el factor estimulante de colonia de granulocitos-monocitos (GM-CSF) (Janke et al., 2007) ha mostrado estimular a las células mononucleares de sangre periférica favoreciendo su respuesta anti-neoplásica. Otra variante recombinante que expresa interleucina-2 (IL-2), ha demostrado mayor efecto oncolítico en células de carcinoma de seno (MCF-7) y adenocarcinoma de colon (HT29) (Zhao et al., 2008). La variante rNDV-IL15 que expresa interleucina-15 (IL-15), cuando se administra intratumoral, es eficaz en suprimir el crecimiento de melanoma en ratones, induciendo la liberación de IFN- $\gamma$  y estimulando la infiltración tumoral por células T CD81

(Niu et al., 2014). Finalmente otra variante recombinante que expresa la glicoproteína del virus de la rabia (rL-RVG) es un potente antitumoral que induce autofagia en células de cáncer gástrico humano (SGC-7901) (Bu et al., 2015).

- *NDV en Neoplasias hematológicas.*

1. AF2240 y V4-UPM (cepas de Malasia). Ambas han sido probadas en células de leucemia mielomonocítica murina (línea WEHI3B), en las que se observó capacidad de inducir citólisis y apoptosis, dosis dependiente pero no ciclo celular dependiente (Alabsi et al., 2011). Además, cuando se ha probado su efecto en modelos murinos (ratones BALB/c con leucemia de ratón) se ha visto que ambas cepas pueden disminuir las células inmaduras en sangre periférica, médula ósea y bazo, disminuyendo significativamente el tamaño y peso del bazo e hígado de estos animales (Alabsi et al., 2012).
2. D-90 (aislado natural) ha mostrado efecto oncolítico sobre células humanas de leucemia monocítica aguda (línea SHI-1), tanto *in vitro* como *in vivo* (ratones desnudos CD-1) (Wang, Song, Li, & Zhang, 2011).
3. Cepa LaSota. Dos variantes obtenidas por recombinación genética han mostrado resultados favorables: una que expresa IL-2 ha mostrado efecto oncolítico sobre linfocitos cancerosos (Jurkat) (Zhao et al., 2008); y con la otra ha mostrado replicación eficiente e inducción de la muerte de células de

mieloma (línea RPMI-8226) (Biswas, Johnson, Kumar, Parks, & Elankumarana, 2012).

## Potencial del NDV a nivel clínico

- *Humanos*

El virus de Newcastle ha sido empleado en al menos 3 ensayos clínicos fase I (Hotte et al., 2007; Laurie et al., 2006; Pecora et al., 2002). En tres ensayos se empleó la cepa PV701, que corresponde a una cepa lítica que proviene de la atenuación de la cepa vacunal MK107. Para estos ensayos clínicos fueron reclutados pacientes con tumores sólidos avanzados y la vía de administración del virus fue endovenosa. En conjunto estos 3 estudios trataron a un total de 113 pacientes, destacando entre los tipos de cáncer: colo-rectal, pancreático, renal, de seno, carcinoma pulmonar de células no pequeñas, anal, ovario y melanoma. Un estudio incluyó a dos pacientes con linfoma (Pecora et al., 2002), sin embargo no se reportó el resultado individual de estos pacientes.

Además de partículas virales infecciosa, a nivel clínico también se han empleado vacunas. En 2004 se publicaron los resultados de un estudio piloto en el que 23 pacientes recibieron una vacuna antitumoral preparada con cultivos de células cancerosas de pacientes con glioblastoma multiforme, las cuales previamente habían sido infectadas con la cepa Ulster e irradiadas. En este estudio no reportaron la presencia de efectos adversos severos y observaron un tiempo medio de supervivencia libre de progresión de 40 semanas (reportándose incluso

respuestas completas) (Steiner et al., 2004). También, se ha demostrado *in vitro* que monocitos humanos estimulados con esta misma cepa (Ulster), tienen la capacidad de matar líneas celulares cancerosas humanas de: carcinoma de seno (BT20 y MCF-7), carcinoma de colon (Colo205) y carcinoma de esófago (Colo680N); en todas ellas, con actividad tumoricida (mediada por TRAIL) inducida después de que los monocitos son estimulados con el virus; esto, independientemente de la replicación viral (Washburn et al., 2003).

- *Perros*

El empleo de virus oncolíticos en esta especie es reciente. A la fecha sólo dos virus han sido empleados *in vivo*. Una variante genética del virus de la Estomatitis vesicular que induce la expresión de interferón beta (IFN $\beta$ ) y el simportador de yoduro de sodio (NIS) en las células a las que infecta, se cree podría tener potencial para el tratamiento del mieloma múltiple y ha mostrado buena tolerancia en perros sanos (LeBlanc et al., 2013). Por otro lado, una cepa atenuada de un virus de la familia *Paramixoviridae*, el virus de Moquillo canino, administrado intra-tumoral (1 millón de UFP) en perros con Linfoma espontáneo, fue capaz de inducir regresión de las lesiones, atacando de forma selectiva a las células cancerosas y sin causar efectos adversos (Henson, Suter, von Messling, Cattaneo, & Fielding, 2005).

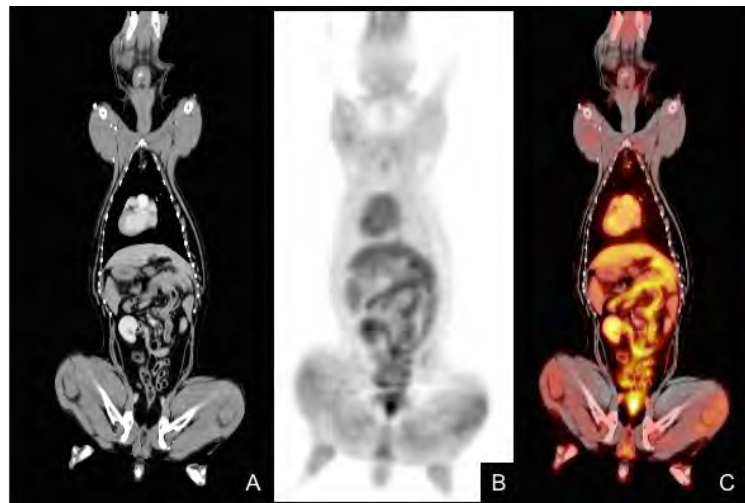
No se han llevado a cabo estudios en perros empleando al virus de Newcastle para la terapia de tumores espontáneos.



## La Tomografía por Emisión de Positrones/Tomografía computarizada (PET/CT) como herramienta en la investigación preclínica oncológica

La posibilidad de llevar a cabo el diagnóstico y seguimiento evolutivo de un paciente con enfermedad oncológica, evaluando la neoplasia no sólo a través de sus características morfológicas sino también metabólicas, permite obtener mayor precisión y detalle del padecimiento (Messa et al., 2004). Una herramienta de diagnóstico por imagen que cubre estas características es la PET/CT. Esta técnica de imagen híbrida, combina un examen de medicina nuclear de carácter funcional (PET) con un estudio radiológico de tipo morfológico (CT), que al fusionarse proporcionan información anatómica y funcional a nivel celular de procesos biológicos *in vivo* (Figura 6). La PET se basa en la detección de la radiactividad de un trazador, sustancia que se inyecta al paciente en estudio y que posee una afinidad tisular conocida. La CT permite la localización anatómica precisa del sitio de acumulación del trazador (Basu et al., 2011). Uno de los trazadores más empleados es la 18-fluoro-2-deoxi-D-glucosa ( $^{18}\text{FDG}$ ). El flúor-18 es un radioisótopo que emite positrones durante su decaimiento radioactivo (proceso en el que un núcleo atómico inestable se transforma en uno más estable). Éste es incorporado al carbono-2 de una molécula análoga de glucosa para producir a la  $^{18}\text{FDG}$ , compuesto con vida media de alrededor de 110 minutos. Al ser un análogo de glucosa, la  $^{18}\text{FDG}$  es transportada al interior de las células por el mismo mecanismo que la glucosa, por difusión pasiva facilitada por proteínas transportadoras. Dentro de la célula la  $^{18}\text{FDG}$  se fosforila pero no se metaboliza, permaneciendo atrapada

en las células. Al comenzar el decaimiento del flúor-18 son emitidos positrones que, posterior a un trayecto de milímetros, chocan con electrones y es así como se generan dos rayos gama que son los que detecta el equipo de PET . (Lawrence, Rohren, & Provenzale, 2010). La utilización de  $^{18}\text{F}$ FDG en la evaluación de pacientes oncológicos se basa en la concentración aumentada de este trazador en el interior de las células cancerosas. Para la interpretación del estudio es necesario obtener una medida de la captación tisular del trazador, denominada valor estandarizado de captación máximo ( $\text{SUV}_{\text{max}}$ , por sus siglas en inglés) (Basu et al., 2011; Lawrence et al., 2010; Messa et al., 2004) .



**Figura 6.** Estudio de PET/CT en un perro sano. Se muestra corte longitudinal de estudio de CT(A), PET (B) y PET/CT (C).

En Medicina Veterinaria el uso de esta técnica de imagen es reciente, sin antecedentes de su empleo en nuestro país (Lee et al., 2010).

## JUSTIFICACIÓN

Los tratamientos convencionales para el cáncer han mejorado considerablemente en los últimos años, sin embargo, una gran cantidad de pacientes con linfoma presentan falta de respuesta inicial, recaída, progresión de la enfermedad y/o efectos deletéreos considerables. Las alternativas no quimioterapéuticas para el tratamiento del cáncer han emergido rápidamente y los virus oncolíticos han mostrado ser una herramienta potencial. Estos virus eliminan a las células malignas por efecto citotóxico directo y/o estimulando al sistema inmune del individuo enfermo. El virus de Newcastle (patógeno específico de aves) ha demostrado efecto oncolítico prometedor en distintos tipos de tumores sólidos, aunque su potencial como alternativa terapéutica de las neoplasias hematológicas ha sido poco estudiada. La relevancia clínica del linfoma humano y canino, así como sus similitudes biológicas, resaltan la importancia del estudio de esta terapia novedosa para el tratamiento de la enfermedad en ambas especies.

El empleo de técnicas de diagnóstico por imagen que permitan evaluar la enfermedad bajo estudio con mayor precisión es de gran importancia. Se requiere la estandarización del procedimiento y obtención de resultados, que permitan obtener imágenes de calidad diagnóstica y los parámetros para una adecuada interpretación de resultados.

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar el potencial terapéutico del virus de Newcastle para el tratamiento de linfoma.

### Objetivos específicos

1. Determinar el efecto oncolítico *in vitro* del virus de Newcastle en células de linfoma canino espontáneo.
2. Determinar el efecto oncolítico *in vitro* del virus de Newcastle en células de linfoma humano.
3. Determinar el efecto oncolítico *in vitro* del virus de Newcastle en células mononucleares de sangre periférica sanas de origen humano y canino.
4. Evaluar la biodistribución del virus de Newcastle en un perro con linfoma espontáneo, posterior a la administración endovenosa.
5. Estandarizar un protocolo para la obtención de imágenes de diagnóstico por PET/CT en perros.

## HIPÓTESIS

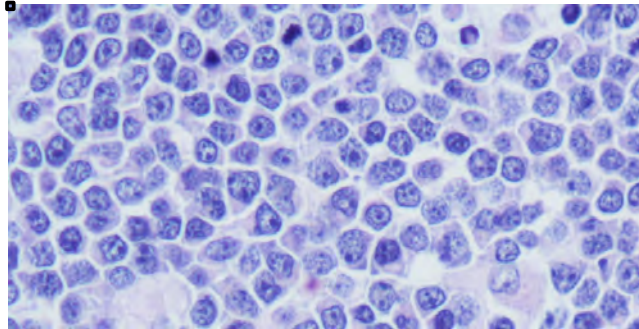
El virus de Newcastle será capaz de inducir la muerte de linfocitos neoplásicos de origen humano y canino, con mínimo efecto sobre linfocitos sanos de ambas especies. Además, la administración endovenosa en un perro con enfermedad espontánea mostrará diseminación restringida.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Células y condiciones de cultivo

- Línea celular SU-DHL-4 de Linfoma humano. Estas células fueron provistas por el Dr. Mario Vega, de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas (UIMEO) del Centro Médico Nacional (CMN) s. XXI. Previo a los experimentos las células fueron cultivadas a confluencia. Se realizaron subcultivos cada tercer día y las células fueron mantenidas en medio medio RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Life Technologies), antibióticos (Penicilina 100UI/mL y estreptomicina 100mg/mL (Life technologies)), y a 37°C en atmósfera humidificada de dióxido de carbono al 5%.
- Células primarias de linfoma canino. Se obtuvieron posterior a la resección quirúrgica del linfonodo de un perro con diagnóstico citológico de la enfermedad. Mediante histopatología se corroboró >90% de células neoplásicas en el espécimen. Estas células fueron suspendidas en SFB (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) con 10% de DMSO (Sigma, St Louis, MO, USA), almacenadas en ultracongelación a -80°C y descongeladas el día del experimento (Figura 7).
- Células mononucleares de sangre periférica (MSP) primarias de origen humano y canino fueron aisladas de donadores sanos. Muestras heparinizadas de sangre completa fueron sometidas a centrifugación por gradiente de densidad con Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Bioscience,

Marlborough, MA, USA), de la interfase fueron aisladas las MSP y posteriormente cultivadas. Las muestras de sangre humana fueron colectadas 24h antes de los experimentos, en tanto que las muestras sanguíneas caninas fueron obtenidas y procesadas el día del experimento. Las células provenientes de ambas especies fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) suplementado con 10% de SFB (Life Technologies), antibióticos (Penicilina 100UI/mL y estreptomina 100mg/mL (Life technologies)), y a 37°C en atmósfera humidificada de dióxido de carbono al 5%.



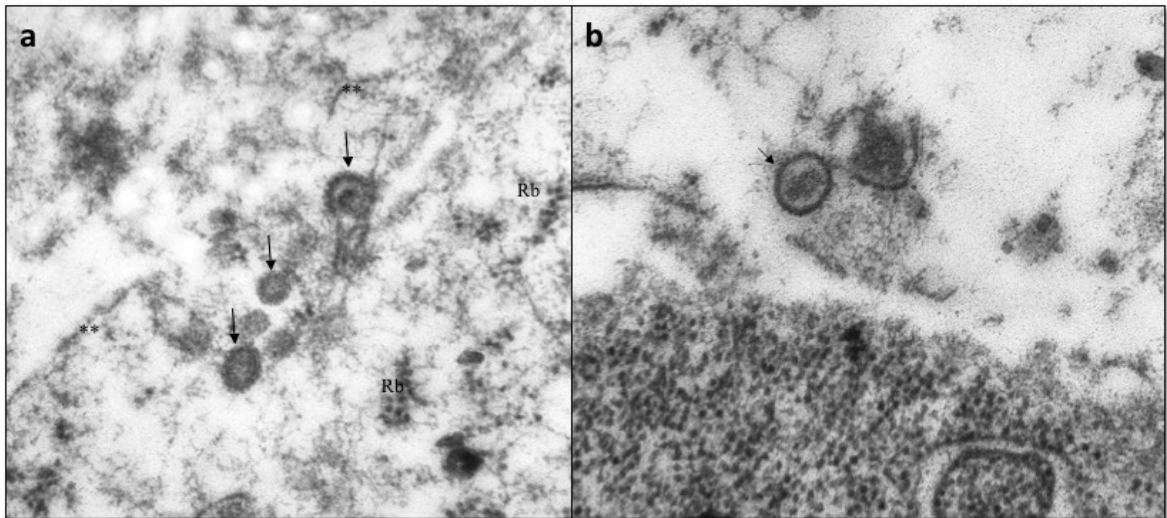
**Figura 7.** Linfoma canino. Corte histológico de linfonodo con más de 90% de infiltración difusa por células neoplásicas (centroblastos e inmunoblastos).

- Células de la línea Vero (ATCC CCL81) fueron cultivadas con medio DMEM (Life Technologies) suplementado con 10% de SFB, antibióticos (Penicilina 100UI/mL y estreptomina 100mg/mL (Life technologies)), y a 37°C en atmósfera humidificada de dióxido de carbono al 5%. Previo a los experimentos las células fueron crecidas a confluencia y subcultivadas cada tercer día. Estas células fueron empleadas para la titulación viral por dosis

infectivas media en cultivo celular (TCID<sub>50</sub> por sus siglas en inglés) mediante el método de Reed-Müench (Reed, 1983).

### Virus de la Enfermedad de Newcastle

Se empleó una cepa lentogénica denominada NDV-MLS, derivada de LaSota. El tiempo medio de muerte embrionaria >90h, la nula citotoxicidad en células renales bovinas Madin-Darby (MDCK) y el tamaño de los sincitios en células Vero infectadas con virus preactivado con tripsina, fueron los parámetros para categorizar a la cepa como lentogénica. Además, mediante microscopía electrónica se documentó su capacidad para infectar células de linfoma *in vivo* (Figura 8).



**Figura 8.** Fotografía electrónica de transmisión del NDV-MLS en células linfoides neoplásica. En el citoplasma se observan partículas virales de 150 nm (flechas) cuya superficie exhibe proyecciones electrodensas. Ribosomas electrodensos libres (Rb). Doble membrana celular (\*). Citoesqueleto (\*\*). Técnica de contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo. Aumento 50 000x.

El virus fue propagado mediante la inoculación de 0.1mL del virus ( $10^8$  TCID<sub>50</sub>/mL) en embriones de pollo libres de patógenos específicos (SPF, ALPES, Puebla, México). Posterior a 3 días de incubación a 38°C, el líquido alantoideo fue colectado de los embriones asépticamente y mediante microaglutinación con eritrocitos de pollo lavados y concentrados al 3% se corroboró la presencia del virus. Se realizaron cultivos microbiológicos para descartar la presencia de agentes contaminantes y mediante análisis Kjeldahl se determinó la concentración proteica del líquido alantoideo (<0.05%). Las alícuotas del virus fueron almacenadas en ultracongelación (-80°C) hasta su uso. La cuantificación viral se llevó a cabo empleado el método de Reed-Munch (Reed, 1983). Brevemente: células Vero fueron cultivadas a confluencia en placas de cultivo de 96 pozos (Nunclon™, Kamstrupvej, Dinamarca); diluciones décuples seriadas del virus previamente incubado con tripsina 0.3μL/mL por dos horas a 37°C fueron adicionadas a las monocapas de células Vero; posteriormente las células fueron incubadas a 37°C en atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5% hasta que la evaluación diaria de los cultivos no mostró progresión del efecto citopático; al término del cultivo las células fueron fijadas con metanol al 100% y teñidas con cristal violeta al 0.2%. El efecto citopático se documentó para el análisis posterior mediante el método Reed-Muench.

### Experimentos de quimiosensibilidad y dosis-respuesta

Con la finalidad de encontrar una concentración de fármacos de quimioterapia capaz de matar a más del 80% de las células malignas y así obtener un control



positivo de alta citotoxicidad, células SU-DHL-4 fueron tratadas a concentraciones 1x-100x de una combinación de ciclofosfamida ( $0.1008 \mu\text{g}/2 \times 10^5$  células por mL), doxorubicina ( $0.00672 \mu\text{g}/2 \times 10^5$  células por mL), vincristina ( $0.000188 \mu\text{g}/2 \times 10^5$  células por mL) y prednisolona ( $0.005376 \mu\text{g}/2 \times 10^5$  células por mL). Se emplearon estos fármacos en combinación debido a que representan el régimen estándar de tratamiento para el Linfoma en ambas especies (CHOP, acrónimo empleado por sus siglas en inglés). Las células fueron sembradas por duplicado o triplicado en placas de cultivo de 48 pozos (Nunclon™), y mantenidas con medio RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) suplementado con 10% de SFB (Life Technologies), antibióticos (Penicilina 100UI/mL y estreptomina 100mg/mL (Life technologies)), y a 37°C en atmósfera humidificada de dióxido de carbono al 5%. La viabilidad celular fue evaluada posterior a 24, 48 y 72 horas del tratamiento, empleando tinción de exclusión con colorante azul tripán y conteo en hemocitómetro, así como citometría de flujo.

Para evaluar el efecto de diferentes multiplicidades de infección (MOI) virales, células SU-DHL-4 fueron sembradas por duplicado o triplicado en placas de cultivo de 48 pozos (Nunclon™), e infectadas con el NDV-MLS a multiplicidades de infección (MOI) de: 0.1, 10 y 100. Las células fueron mantenidas en medio RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) suplementado con 10% de SFB (Life Technologies), antibióticos (Penicilina 100UI/mL y estreptomina 100mg/mL (Life technologies)), y a 37°C en atmósfera humidificada de dióxido de carbono al 5%. La viabilidad celular fue evaluada 48 y 72 horas post-infección, empleando tinción de

exclusión con colorante azul tripán y conteo en hemocitómetro, así como citometría de flujo.

## Ensayo de citotoxicidad

Células sanas y cancerosas fueron sembradas por duplicado o triplicado en placas de cultivo de 48 pozos (Nunclon™) e incubadas con: a) virus, b) líquido alantoideo libre de virus o c) CHOP. Posterior a 72 horas se evaluó la viabilidad mediante la técnica de exclusión con colorante azul tripán (Strober, 2001) y citometría de flujo. La viabilidad celular se normalizó respecto al control negativo y fue expresado como la media del porcentaje de células viables  $\pm$  el error estándar de la media (SEM por sus siglas e inglés).

## Citometría de flujo

La viabilidad celular fue corroborada mediante citometría de flujo multiparamétrica en un citómetro FACSCanto (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), empleando una doble tinción con Anexina V/Ioduro de propidio. Posterior a 72h de la exposición de las células a líquido alantoideo libre de virus, quimioterapia CHOP o al NDV-MLS MOI 100, las células fueron cosechadas, cuantificadas, lavadas dos veces con buffer PBS e incubadas con ioduro de propidio y anexina V conjugada con aloficocianina (APC), en un buffer de unión a anexina, a temperatura ambiente (TA), en oscuridad, durante 15 minutos, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Annexin V Apoptosis Detection Kit APC, Affymetrix e Bioscience, San

Diego Ca, USA). Adicionalmente, las células B sanas humanas fueron identificadas por inmunofenotipo, empleando una tinción CD19-FITC. El análisis de los datos de citometría de flujo se llevó a cabo empleando el software FlowJo 9.0 (FLOWJO, LLC: Ashland, OR, USA). Finalmente los valores de rendimiento fueron calculados con base en las frecuencias poblacionales específicas para cada condición.

### Distribución temprana selectiva del NDV-MLS en un modelo canino de enfermedad espontánea

Previo consentimiento informado del propietario, un paciente canino que había desarrollado linfoma de forma natural, recibió una dosis endovenosa del NDV-MLS ( $1 \times 10^{12}$  TCID<sub>50</sub>) con el fin de estudiar la biodistribución viral. El perro se encontraba en fase terminal, pre-mortem, con diagnóstico de linfoma agresivo de células T. La cantidad de virus que se administró fue calculada tomando en consideración las dosis reportadas de los ensayos clínicos en humanos (Hotte et al., 2007; Laurie et al., 2006; Pecora et al., 2002). Previo a la administración del virus y con el perro bajo anestesia, se tomaron biopsias de linfonodo y médula ósea; estos tejidos fueron fijados en formalina al 10%, incluidos en parafina y los cortes fueron analizados por hemato-patólogos. Las secciones de tejido fueron teñidas con Hematoxilina-Eosina (H&E). Se utilizaron dos anticuerpos para determinar el origen celular, un anticuerpo murino anti CD79a humano (Spring Bioscience Corp., Pleasanton, CA, USA) y un anticuerpo anti- CD3 (Dako, Carpinteria, CA, USA), como marcadores de células B y T respectivamente.

Con la finalidad de prevenir dolor y náusea, se administraron los siguientes medicamentos: meloxicam (ácido enólico que bloquea a la ciclooxigenasa), tramadol (analgésico tipo narcótico antagonista de receptores opioides  $\mu$ , que bloquea la recaptación de norepinefrina y serotonina), ondansetrón (antagonista de los receptores de serotonina 5-HT<sub>3</sub>) y ranitidina (antagonista de receptores H<sub>2</sub> de histamina) como protector de mucosa gástrica. No existen reportes de la interferencia de alguno de estos fármacos en la biodistribución viral, sin embargo esta posibilidad no puede ser completamente descartada. Aunque no existen reportes de la transmisión del virus entre mamíferos, se siguieron medidas estándar de seguridad con los propietarios y el personal médico que estuvo en contacto con el perro.

### Análisis pos-mortem de la biodistribución viral

El perro falleció 24h posterior a la administración del NDV-MLS. Durante la necropsia se tomaron muestras de distintos tejidos, cada una de ellas se conservó: a) en formalina 10% y 2) sin aditivos en ultra congelación a -80°C. Las muestras en formalina posteriormente fueron incluidas en parafina y seccionadas para su análisis con tinción H&E así como para análisis de inmunohistoquímica (IHQ) empleando un anticuerpo contra la hemoaglutinina-neuraminidasa (HN) del virus (antibodies-online Inc., Atlanta, GA, USA). La tinción de IHQ se realizó mediante la técnica de inmunoperoxidasa, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, los tejidos fueron seccionados y los cortes fueron calentados en buffer de citrato de

sodio 0.01M, pH 6.0 a 99-100°C por 15-20 minutos. Posteriormente se mantuvieron 20min en el buffer sin calor. Las secciones fueron lavadas dos veces con solución tween 20-tris-buffer salino (TBST) por 5 minutos a temperatura ambiente (TA). La peroxidasa endógena fue bloqueada con 3% de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por 40 minutos. Se aplicó un bloqueador universal de proteína (suero normal de cabra 5%) durante dos horas a TA y subsecuentemente se incubó durante la noche, a 4°C, con un anticuerpo policlonal de conejo anti-NDV (antibodies-online Inc., Atlanta, GA, USA), a 4°C. Como control de isotipo se empleó IgG de suero normal de conejo al 5%. Las laminillas fueron lavadas dos veces con TBST y el anticuerpo secundario fue adicionado por dos horas a TA, con agitación gentil, después se volvió a lavar dos veces con TBST, revelando con cromogen por 10 minutos a TA y lavando con agua destilada por 1 minuto. Como controles negativos se empleó tejido sano de pollo y de perro (linfonodo). Como control positivo se empleó tejido de pollo previamente infectado con el NDV-MLS. Entre los tejidos almacenados sin aditivos en ultracongelación a -80°C, se encontraban sangre y líquido cefalorraquídeo.

### Aislamiento de RNA y reacción en cadena de polimerasa-transcripción reversa (RT-PCR)

La extracción de RNA de las muestras sólidas (tejidos, pellet celular) y líquidas (suero y líquido céfalo-raquídeo) se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit/QIAamp Viral RNA Mini Kit, QUIAGEN, Valencia, CA,

USA, respectivamente). Los iniciadores (*primers*) usados para la RT-PCR punto final (Tabla 1), fueron generados a partir del alineamiento de secuencias publicadas de nucleótidos conservados del NDV. El fragmento amplificado correspondió a un fragmento de 527 pares de bases (pb) del gen de la nucleoproteína (NP). Para la transcripción reversa (RT) fue adicionada la siguiente mezcla de reacción a 0.5µL del ácido nucleico extraído: 2µL de 10mM de oligos, 0.5µL de mezcla de dNTP 10mM, 2µL de buffer, 0.5µL de polimerasa y 0.2µL de inhibidor de RNasa, para un volumen de reacción de 10.2µL. Como control positivo se emplearon 5µL de ácido nucleico extraído del NDV-MLS. Como control negativo se empleó agua estéril. Posteriormente la reacción fue incubada en un termociclador bajo las siguientes condiciones: a) para la RT: 50°C por 30 minutos y 95°C por 15 minutos; b) para la PCR: 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C (desnaturalización); 55°C por 30 segundos (alineamiento); y 72°C por 1 minuto (extensión). Las muestras fueron enfriadas a 4°C, procesadas en E-gel® de agarosa al 2% (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma, USA) y documentadas mediante fotografías.

Gen	Secuencias de los primers	Largo del producto (pb)
NP	FP: 5'- ACCAAACAGAGAATCCGTGAGTTACGATAA - 3' RP: 5'- GGAGAGATCCTGCTATCATCGCAAATCT -3'	527

NP: Nucleoproteína; FP: Forward primer; RP: Reverse primer

**Tabla 1.** Primers empleados para la detección del NDV-MLS por RT-PCR punto final.

El RNA de las muestras líquidas fue extraído y amplificado en reacciones múltiples usando StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems,

Foster City, Ca, USA) y una combinación de sondas/iniciadores específicos con control positivo interno para el NDV (FIND-IT Newcastle kit, BioTecMol, México). Cada muestra fue tratada con el buffer de lisis más el acarreador incluido en el RNeasy Mini Kit/QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN). El RNA fue extraído de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La RT-PCR cuantitativa en tiempo real específica para el NDV, fue llevada a cabo empleando 10µL de RNA en el StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems), usando TaqMan NDV Virus 1-step RT-PCR-TR 2x (BioTecMol) en un volumen final de 20µL. Las condiciones de ciclado fueron: 30 minutos a 42°C, 10 minutos a 95°C (40 ciclos de 15 segundos a 95°C) y 45 segundos a 60°C.

### Estudios de PET/CT en perros sanos

Se incluyeron 4 perros (2 hembras y 2 machos) sanos (corroborado por pruebas de laboratorio y valoración clínica), con un rango de edad de 3-10 años (media de 6 años). Se utilizó <sup>18</sup>FDG administrada por vía intravenosa, a dosis de 0.2mCi/Kg. Los perros estuvieron en ayuno durante 8 horas y fueron restringidos de actividad física vigorosa previo al estudio, además, se corroboró su estado normoglucémico inmediatamente antes de la administración del radiofármaco. Una vez inyectada la <sup>18</sup>FDG se mantuvieron en penumbra, silencio, reposo absoluto y a temperatura ambiente. La adquisición de las imágenes de cuerpo completo se llevó a cabo en un tomógrafo PET/CT Siemens Biograph 16, con escáner de CT Phillips MX 8000D de corte dual y PET escáner Allegro. La adquisición de imágenes de CT

se realizó con medio de contraste iodado, hipoosmolar no iónico (Ioversol) a dosis de 0.4mg/Kg en infusión endovenosa. Una vez procesados los estudios se determinó el valor estandarizado de captación máxima ( $SUV_{max}$ ) en tejidos sanos de interés. Todos los estudios se realizaron bajo anestesia general, inducida con propofol y mantenida con isoflurano.

### Consideraciones éticas

Los experimentos que involucraron el trabajo con perros se realizaron previo consentimiento informado por parte del propietario, y fueron llevados a cabo por profesional médico veterinario que aseguró el bienestar animal en todo momento. Todos los procedimientos fueron llevados acorde a los lineamientos establecidos por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Nacional Autónoma de México (Protocolo DC-2015-2-5).

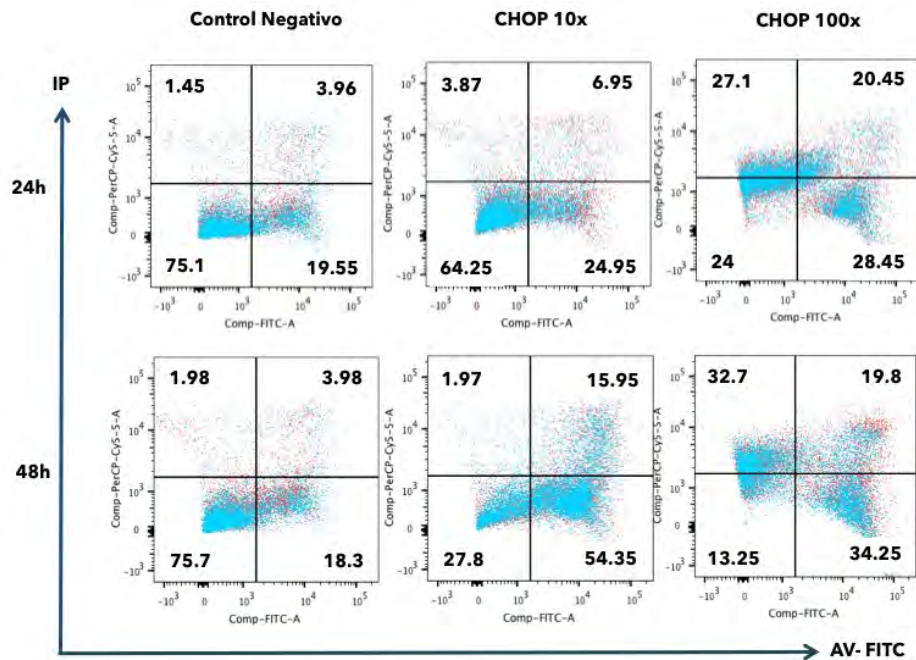
### Análisis estadístico

Se empleó el software Prisma (versión 6.0, GraphPad, La Jolla, CA, USA) y los datos fueron expresados como la media  $\pm$  SEM de experimentos independientes. Para hacer comparaciones entre grupos, se empleó el análisis ordinario de ANOVA de una sola vía, con la prueba de comparación múltiple Bonferroni o Tukey.

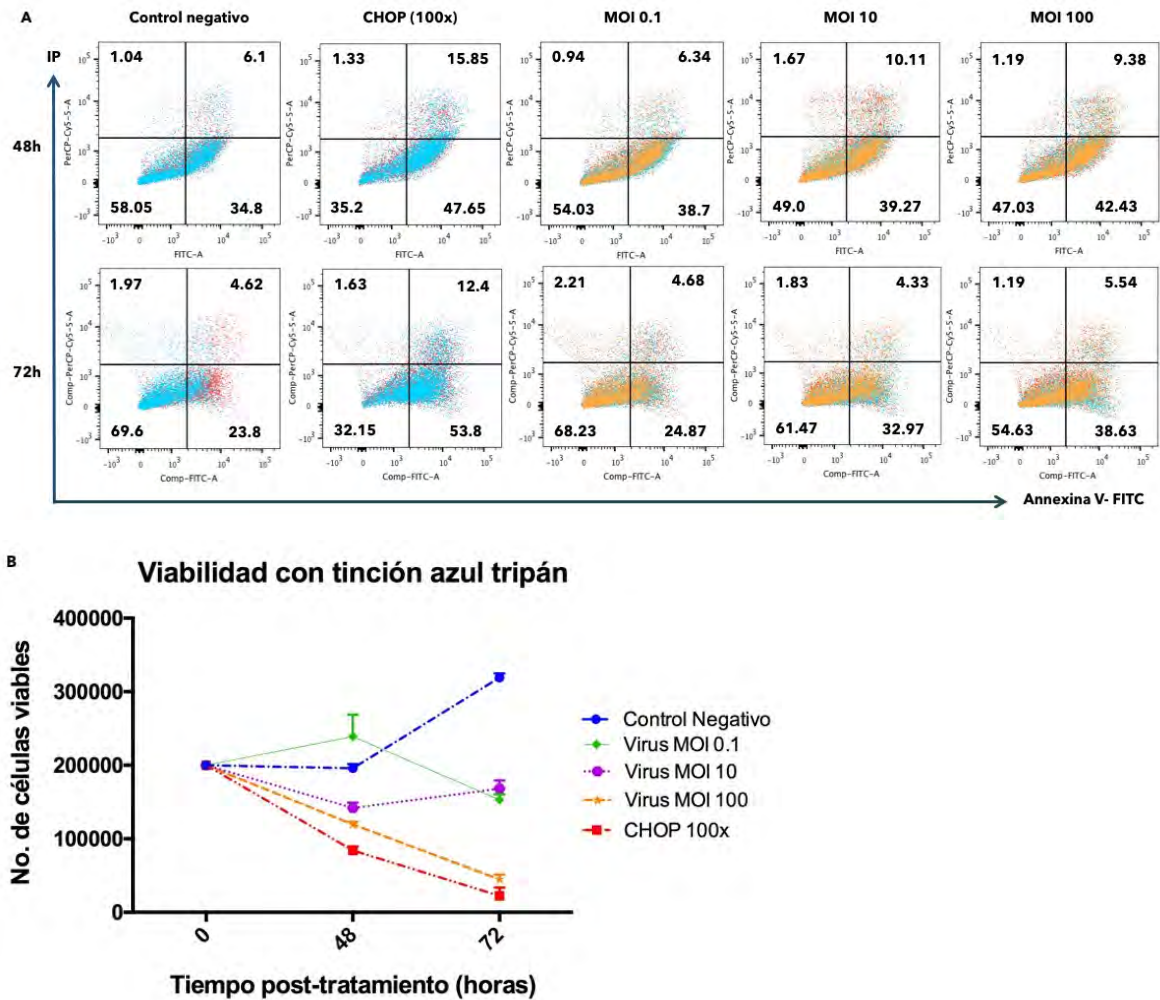


## RESULTADOS

Experimentos previos mostraron que posterior a 72 horas de tratamiento se lograba un efecto de alta citotoxicidad con CHOP 100x, consistencia con el efecto de la MOI 100 y se mantenía la proliferación esperada en aquellas células de los controles, por lo tanto, estos fueron los parámetros empleados en experimentos subsecuentes, para evaluar el efecto del virus en las células sanas y cancerosas de humano y perro (Figuras 9 y 10).



**Figura 9.** Citotoxicidad del esquema CHOP en células SU-DHL-4. Imagen representativa de citometría de flujo empleando una doble tinción con Anexina V-isotiocianato de fluoresceína (AV-FITC) y yoduro de propidio (IP), 24 y 48 horas post-tratamiento con CHOP 10x y 100x. El control negativo no refleja la proliferación celular esperada con el paso del tiempo.



**Figura 10.** Citotoxicidad de CHOP 100x y virus NDV-MLS a distintas MOI, 48 y 72 horas post-tratamiento. Imagen representativa de citometría de flujo empleando una doble tinción con Anexina V-FITC/IP, 48 y 72 horas pos-tratamiento con CHOP 100x y virus a MOI 0.1, 10 y 100 (A). Se observa una alta citotoxicidad con CHOP 100x 72 horas post-tratamiento, reflejado en la disminución de la viabilidad celular a menos del 20% (B).

El NDV-MLS es capaz de matar selectivamente linfocitos malignos de origen humano y canino

Primero investigamos si el NDV era capaz de inducir la muerte de linfocitos malignos de origen humano y canino *in vitro*. Llevamos a cabo experimentos de citotoxicidad en células de linfoma humano (línea celular SU-DHL-4) y en células primarias de linfoma canino, usando el NDV-MLS a una multiplicidad de infección (MOI) de 100 o la combinación de fármacos quimioterapéuticos CHOP (ciclofosfamida, hidroxidaunorubicina, oncovin <vincristina> y prednisolona). La viabilidad celular fue analizada por exclusión de colorante con tinción azul tripán, 72h posteriores a la infección, así como por citometría de flujo multiparamétrica. En ambos tipos celulares se observó efecto citotóxico (Figura 10). En las células de linfoma canino, la viabilidad celular disminuyó al  $43\% \pm 3.5\%$ . En el control positivo de alta citotoxicidad (CHOP) se observó disminución de la viabilidad al  $39\% \pm 7.5\%$ . El tratamiento viral en las células humanas SU-DHL-4, disminuyó la viabilidad celular al  $52\% \pm 9.4\%$ . En el control de alta citotoxicidad (CHOP) se observó disminución de la viabilidad al  $34\% \pm 6.9\%$ .

El efecto oncolítico del NDV-MLS en ambos tipos celulares se confirmó posteriormente mediante citometría de flujo multiparamétrica, empleando una doble tinción con anexina V-APC (aloficocianina) y yoduro de propidio (IP). Se consideraron como células viables aquellas negativas a la doble tinción. Se corroboró la disminución de la viabilidad celular en ambos tipos celulares posterior a la infección viral. En las células humanas la viabilidad celular disminuyó a  $41.2 \pm$

5.9% y a  $59.5\% \pm 14.8\%$  en el caso de las caninas. Las células tratadas con CHOP mostraron disminución de la viabilidad a un  $12.7 \pm 1.1\%$  y  $10.1\% \pm 3.1\%$  en las células humanas y caninas respectivamente (Figura 11).

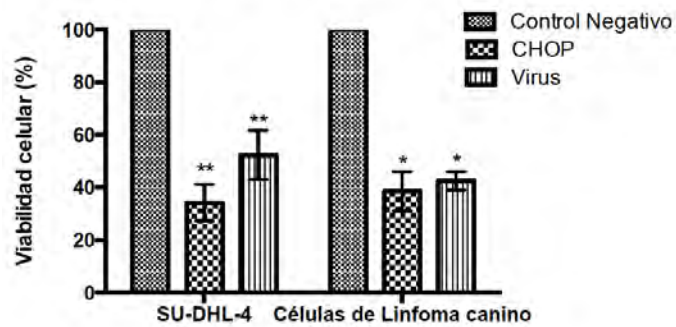
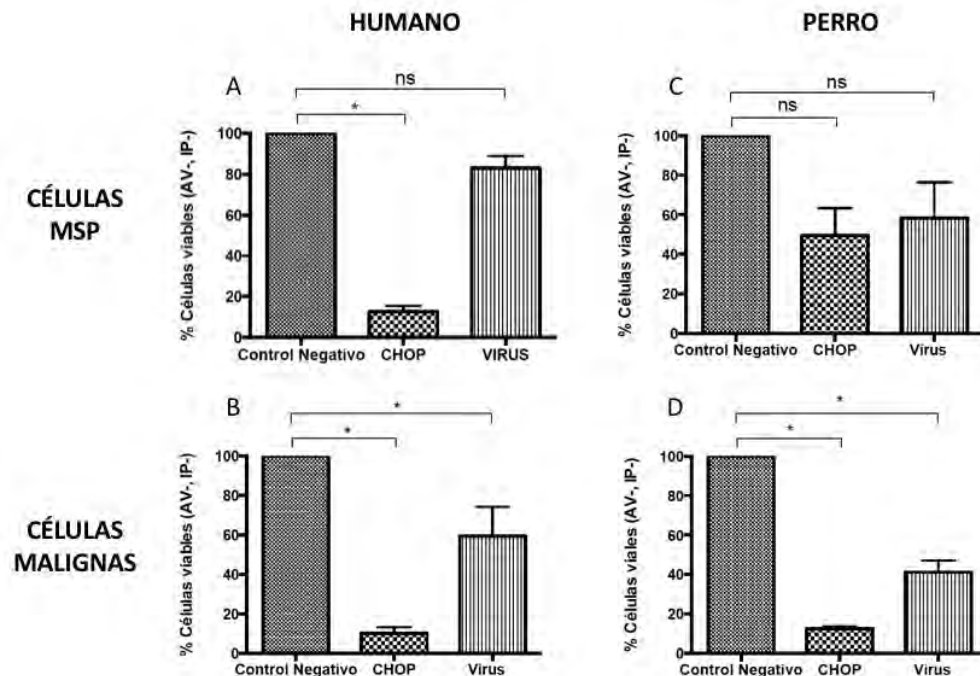


Figura 11. Citotoxicidad del NDV-MLS en células linfoides humanas malignas (SU-DHL-4) y en células primarias derivadas de linfoma canino. La viabilidad fue evaluada mediante tinción con azul tripán a las 72h post-infección. La figura muestra la media del porcentaje de viabilidad  $\pm$  SEM de 5 experimentos independientes. En ambos tipos celulares se observa una disminución significativa de la viabilidad celular, en comparación con el control negativo (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ ).

Las células mononucleares de sangre periférica (MSP) son menos sensibles al efecto del NDV-MLS

Es conocido el efecto preferencial de los virus oncolíticos sobre las células cancerosas (Buijs, Verhagen, van Eijck, & van den Hoogen, 2015). En tumores sólidos el virus de Newcastle ha mostrado esta selectividad. Investigamos la

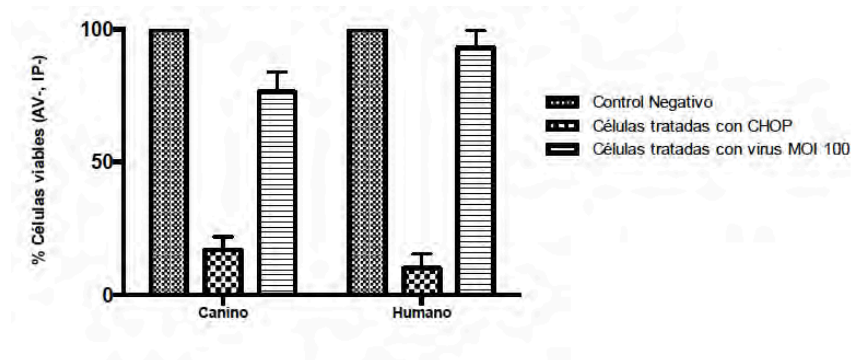
capacidad citotóxica del NDV sobre células linfoides malignas así como en células mononucleares de sangre periférica (MSP) de origen humano y canino. Infectamos células MSP sanas de ambas especies, y posterior a 72h de infección llevamos a cabo citometría de flujo multiparamétrica y doble tinción con Anexina V-APC/IP. Los linfocitos malignos de origen humano (SU-DHL-4) fueron más sensibles al efecto citotóxico del NDV que su contraparte sana, con una disminución de la viabilidad celular al  $59.9\% \pm 25.7\%$ , y  $83.1\% \pm 10.1\%$  respectivamente. En los perros se observó una tendencia de citotoxicidad preferencial sobre los linfocitos malignos *versus* las células MSP:  $41.3\% \pm 8.3\%$  y  $58.4\% \pm 25\%$  respectivamente (Figura 12).



**Figura 12.** Citotoxicidad del NDV-MLS en células linfoides sanas y cancerosas de perro y humano. Efecto del NDV-MLS sobre la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica de origen humano (A) y células SU-DHL-4 (B), así como en

células mononucleares de sangre periférica caninas (C) y células caninas de linfoma (D), posterior a 72h de infección. Las células fueron analizadas mediante citometría de flujo, posterior a una doble tinción con anexina V y yoduro de propidio. La figura muestra el análisis cuantitativo de las células negativas a ambas tinciones, las cuales fueron consideradas como células viables. Los resultados son representativos de 5 experimentos independientes y muestran un efecto citotóxico estadísticamente significativo sobre células de linfoma humanas y de origen canino (\* $p < 0.005$ , ns: no significativo).

Cabe mencionar que la sensibilidad del virus sobre las células de origen canino fue variable. En experimentos en los que sólo se comparó el efecto del virus sobre células MSP humanas y caninas, las células humanas no fueron sensibles al efecto citotóxico del virus, en tanto que las de origen canino fueron susceptibles pero mostrando una disminución de la viabilidad en sólo 20% (Figura 13). Es posible que la variabilidad interindividual pueda ser responsable de estos hallazgos, dado que las células empleadas provenían de distintos perros.

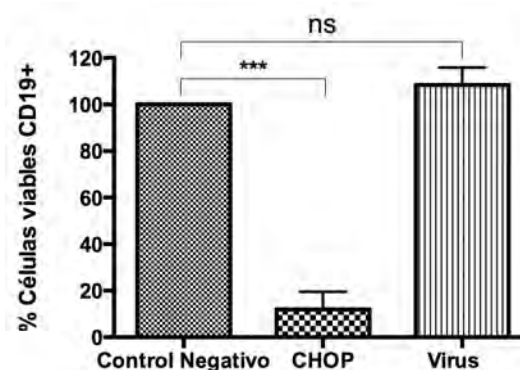


**Figura 13.** Citotoxicidad del NDV-MLS en células mononucleares de sangre periférica de origen humano y canino. Después de 72 de infección las células

fueron teñidas con anexina V e ioduro de propidio para llevar a cabo citometría de flujo. Las células que fueron negativas a ambas tinciones se consideraron células viables. Las barras representan el resultado de dos experimentos independientes.

### Los linfocitos humanos sanos de estirpe B no son sensibles al efecto citotóxico del NDV-MLS

Debido a la citotoxicidad del virus en linfocitos B malignos, decidimos evaluar su efecto en linfocitos B sanos. Células mononucleares de sangre periférica de humanos sanos fueron infectadas con el virus y teñidas con Anexina V-APC/IP/CD19-FITC para llevar a cabo citometría de flujo. Como se esperaba, la viabilidad de las células disminuyó marcadamente con el tratamiento con CHOP, mientras que no se observó citotoxicidad sobre las células B sanas. La viabilidad de los linfocitos B disminuyó al  $12\% \pm 7.6$  con CHOP, en tanto que se mantuvo en  $108.3\% \pm 7.5\%$  cuando las células fueron expuestas al virus (Figura 14).

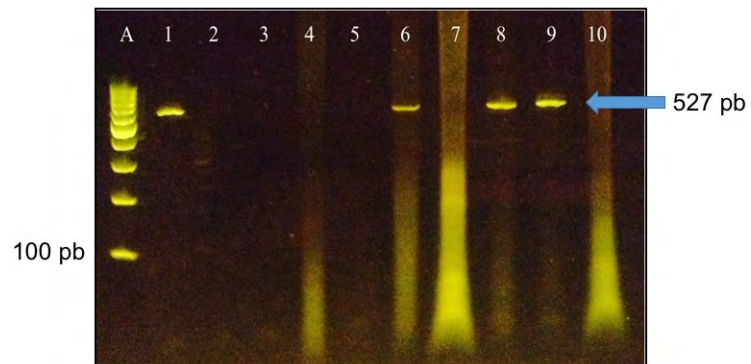


**Figura 14.** Efecto del NDV-MLS sobre células CD19 positivas de origen humano. Posterior a 72 de infección las células fueron teñidas con Anexina V-APC/IP/CD19-FITC y analizadas mediante citometría de flujo. Se muestra el análisis cuantitativo

de las células CD 19 viables (anexina V -, IP -). Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. Las células B sanas no mostraron disminución de la viabilidad posterior a la exposición al virus, en tanto que fueron altamente sensibles al efecto de la quimioterapia CHOP. \*\*  $p < 0.0001$ , ns: no significativo.

### La biodistribución viral temprana en un perro con linfoma espontáneo no mostró ser extensa

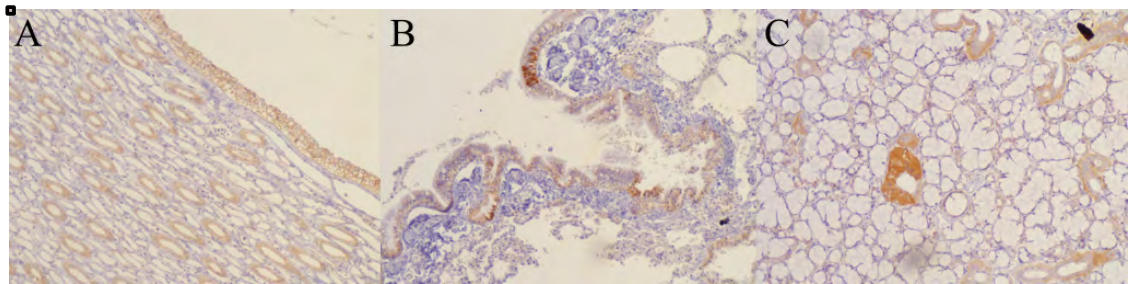
Se realizó el análisis post-mortem de la distribución viral, después de 24h de su administrado a dosis de  $1 \times 10^{12}$  TCID<sub>50</sub>, por vía endovenosa, en un perro con linfoma espontáneo. El perro había sido diagnosticado con un linfoma de células T en estadio terminal. El inmunofenotipo fue confirmado por inmunohistoquímica positiva a CD3. Posterior a la muerte del perro se obtuvieron muestras de distintos tejidos, los cuales fueron analizados para detectar la presencia de RNA viral mediante reacción en cadena de la polimerasa – transcripción reversa (RT-PCR). Sólo se encontraron positivos: glándula salival, tejido gástrico y tejido renal (Figura 15). No se descarta la posibilidad de que tejidos negativos no hayan mostrado amplificación del RNA debido a un bajo nivel de infección.





**Figura 15.** RT-PCR punto final de tejidos caninos post-mortem. La amplificación de la banda de 527 pares de bases corresponde a un fragmento del gen del NDV que codifica para la nucleoproteína (NP). El carril A corresponde a un marcador de peso molecular (100pb); carril 1: Control positivo (extracción del RNA del NDV-MLS); carriles 1 y 3: controles negativos (agua estéril); carriles 6, 8 y 9: tejido gástrico, renal y glándula salival respectivamente.

No se observaron cambios patológicos microscópicos en los tejidos no cancerosos. Posteriormente y con la finalidad de confirmar la presencia de proteínas virales en los tejidos, se llevaron a cabo tinciones de IHQ. Sólo tres tejidos sanos fueron positivos a la proteína HN (hemoaglutinina-neuraminidasa) viral: pulmón, glándula salival y tejido renal (Figura 16). En el tejido linfoide maligno no se encontró la presencia de la NP viral.



**Figura 16.** Tinciones de Inmunohistoquímica (IHQ) con un anticuerpo policlonal de conejo, contra la proteína HN del virus de Newcastle. Los tejidos positivos (teñidos en café) se muestran en: A riñón, B pulmón y C glándula salival (amplificación 10x).

## Parámetros para la adquisición de imágenes PET/CT en perros sanos empleando $^{18}\text{F}$ FDG

Todos los perros fueron inyectados con 0.2 mCi/Kg de  $^{18}\text{F}$ FDG. En un primer perro la adquisición de imágenes se realizó posterior a 45 minutos (Hansen, McEvoy, Engelholm, Law, & Kristensen, 2011; Lee et al., 2010), sin éxito ya que el radiofármaco se encontró en su totalidad en vejiga. En los otros 3 perros se obtuvieron imágenes de calidad diagnóstica llevando a cabo la adquisición de imágenes 20-30 minutos posterior a la inyección del radiofármaco (Figura 17). En estos perros además se obtuvieron los valores estandarizados de captación máxima ( $\text{SUV}_{\text{max}}$ ) en tejidos sanos (Tabla 2).



**Figura 17.** Imagen PET/CT de perro con linfoma. Se muestra corte longitudinal de imágenes de CT (A), PET(B) y PET/CT (C), obtenidas en equipo PET/CT Siemens Biograph 16.

Tejido sano	SUV <sub>max</sub> (Media ± Desviación estándar)
Cerebro	5.93 ± 2.3
Ventrículo izquierdo	3.87 ± 1.76
Hígado	1.93 ± 0.25
Bazo	1.57 ± 0.06
Riñón derecho	4.3 ± 0.46
Riñón izquierdo	3.87 ± 0.9
Vejiga	178 ± 23.6

**Tabla 2.** Valores estandarizados de captación máxima (SUV<sub>max</sub>) de <sup>18</sup>FDG en tejidos de 3 perros sanos.

## DISCUSIÓN

Resultados previos han mostrado el potencial terapéutico de los virus oncolíticos en neoplasias hematológicas. Han destacado los resultados obtenidos *in vitro* con el virus de sarampión en leucemia aguda y linfocítica crónica, e *in vivo* en mieloma. También adenovirus D ha mostrado potencial terapéutico *in vitro* en linfoma y leucemia linfocítica crónica, e *in vivo* en un modelo murino de linfoma (Chen et al., 2011; Patel et al., 2011; Russell et al., 2014). El virus de Newcastle ha sido propuesto como un agente terapéutico potencial en cáncer, debido a su habilidad para matar células malignas de forma preferencial respecto a las células sanas (Cuadrado-Castano, Sanchez-Aparicio, Garcia-Sastre, & Villar, 2015). En estudios *in vitro* empleando células de tumores sólidos, la cepa LaSota y variantes genéticas de la misma han mostrado resultados alentadores (Elankumaran et al., 2010; Janke et al., 2007; Walter et al., 2012). En neoplasias hematológicas: una

variante genética de LaSota ha sido probada en blastos leucémicos y en líneas celulares de mieloma (Biswas et al., 2012; Zhao et al., 2008); y en dos estudios previos que emplearon cepas lentogénicas y mesogénicas fue reportada sensibilidad de linfocitos B malignos humanos (Burkitt Daudi) al virus (Bar-Eli, Giloh, Schlesinger, & Zakay-Rones, 1996; Tzadok-David, Metzkin-Eizenberg, & Zakay-Rones, 1995).

En este trabajo reportamos los resultados *in vitro* de una cepa lentogénica (no recombinante) del virus de Newcastle (NDV-MLS), sobre células de linfoma (primarias caninas y sobre la línea SU-DHL-4 humanas) así como en mononucleares de sangre periférica de origen humano y canino. Además, reportamos la distribución temprana del virus en un perro con enfermedad espontánea. Encontramos que el NDV-MLS muestra citotoxicidad preferencial sobre células B malignas de origen humano y canino. Los linfomas de células B, son los subtipos de mayor prevalencia en ambas especies (Álvarez Berger, Aburto Fernández, Gerardo, & Chávez Gris, 2009; Guija de Arespacochaga, Schwendenwein, & Weissenbock, 2007; Morton et al., 2006; Vezzali, Parodi, Marcato, & Bettini, 2010).

Por otro lado también demostramos citotoxicidad diferencial sobre células mononucleares de sangre periférica sanas. Se sabe que la selectividad del NDV para replicarse en células cancerosas humanas está dado principalmente por la pobre respuesta de interferón tipo I (principalmente  $\beta$ ) por parte de estas células, haciéndolas incapaces de inducir una rápida y sostenida producción de proteínas

antivirales (Fiola et al., 2006; Krishnamurthy et al., 2006). Esta citotoxicidad selectiva también ha sido atribuida a la sobre-expresión de proteínas como Bcl-xL, por ejemplo en células de cáncer pulmonar (A540), en las que el efecto oncolítico incrementa (Mansour et al., 2011). La selectividad del NDV-MLS hacia células cancerosas de humano y perro, a diferencia de las mononucleares de sangre periférica y B sanas, resulta relevante para trabajos *in vivo* futuros, así como el estudio de los mecanismos que favorecen esta selectividad.

El beneficio de usar un virus de origen aviar para tratar cáncer en mamíferos es la ausencia de exposición previa del individuo al agente y por tanto la falta de anticuerpos neutralizantes. El emplear una cepa lentogénica además facilita el manejo del virus, al representar menor riesgo de diseminación o infección dada la baja virulencia y patogenicidad viral. La principal ventaja de esta aproximación terapéutica es la posibilidad de tratar pacientes humanos así como otros mamíferos, potencial beneficio para la medicina humana y veterinaria (Beetz, Julius, Turner, & Kotrschal, 2012; Beetz, Uvnas-Moberg, Julius, & Kotrschal, 2012; Ito et al., 2014; McNicholas et al., 2005; R. C. Regan, Kaplan, & Bailey, 2013; Vail, 2013).

En perros sólo el virus de la estomatitis vesicular ha sido empleado para tratar neoplasias hematológicas (mieloma). El NDV nunca ha sido empleado en perros con cáncer. Un estudio reciente mostró que la administración endovenosa de una cepa LaSota recombinante a primates no-humanos sanos, fue segura a dosis escaladas desde  $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^9$   $\text{DIE}_{50}$  o  $\text{TCID}_{50}$  (Buijs et al., 2014). En relación a reportes en humanos, otras cepas no recombinantes del virus de Newcastle han sido empleadas en pacientes con tumores sólidos avanzados o metastásicos (Hotte

et al., 2007; Pecora et al., 2002). En un grupo de pacientes tratados con la cepa PV107 (cepa derivada de la cepa vacunal MK 107), los autores reportaron la inclusión de tres pacientes con linfoma, aunque no reportaron los resultados observados en estos pacientes en particular (Pecora et al., 2002). Reacciones agudas (principalmente dolor de pecho y espalda no cardiogénico, e hipertensión) ocurrieron dentro de los 5 minutos posteriores al inicio del tratamiento (virus en infusión IV) y resolvieron de forma espontánea entre 30min y una hora posterior al término del tratamiento (Hotte et al., 2007; Pecora et al., 2002). En este estudio una dosis endovenosa de  $1 \times 10^{12}$  TCID<sub>50</sub> del NDV-ML no causó reacciones agudas en el perro y sólo mostró diseminación limitada temprana en los tejidos sanos. Encontramos tinción de inmunohistoquímica positiva para el virus sólo en glándula salival, tejido renal y gástrico, reflejando un posible potencial tóxico en estos tejidos sanos de individuos enfermos. No encontramos partículas virales en tejido tumoral 24h posterior a la infusión endovenosa del virus; considerando que el NDV-MLS es una cepa lentogénica, es posible que se requieran periodos más largos para la diseminación viral en el tejido tumoral. Este es el primer reporte de la biodistribución del virus de Newcastle en linfoma espontáneo.

## CONCLUSIONES

Concluimos que el NDV-MLS, cepa no patógena para mamíferos, es un agente prometedor para el tratamiento de humanos y perros con linfomas difusos de células B. Es necesario continuar con la investigación para elucidar los tipos de linfomas tanto B, T o NK que son susceptibles al NDV-MSL. Se desconocen los regímenes terapéuticos óptimos además de ser importante el establecimiento de medidas de bioseguridad necesarias, con la finalidad de prevenir la diseminación ambiental del virus.

## REFERENCIAS

- Alabsi, A. M., Ali, R., Ideris, A., Omar, A. R., Bejo, M. H., Yusoff, K., & Ali, A. M. (2012). Anti-leukemic activity of Newcastle disease virus strains AF2240 and V4-UPM in murine myelomonocytic leukemia in vivo. *Leuk Res*, 36(5), 634-645. doi:10.1016/j.leukres.2011.11.001
- Alabsi, A. M., Bakar, S. A., Ali, R., Omar, A. R., Bejo, M. H., Ideris, A., & Ali, A. M. (2011). Effects of newcastle disease virus strains AF2240 and V4-UPM on cytolysis and apoptosis of leukemia cell lines. *Int J Mol Sci*, 12(12), 8645-8660. doi:10.3390/ijms12128645
- Aldous, E., & Alexander, D. (2001). Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). *Avian pathology*, 30(2), 117-128.
- Ali, R., Alabsi, A. M., Ali, A. M., Ideris, A., Omar, A. R., Yusoff, K., & Saif-Ali, R. (2011). Cytolytic effects and apoptosis induction of Newcastle disease virus strain AF2240 on anaplastic astrocytoma brain tumor cell line. *Neurochem Res*, 36(11), 2051-2062. doi:10.1007/s11064-011-0529-8
- Álvarez Berger, F. J., Aburto Fernández, E., Gerardo, A. U., & Chávez Gris, G. (2009). Estudio histológico e inmunofenotípico de linfoma canino en el centro de México. *Veterinaria México*, 40, 141-155.
- Appleton, E. S., Turnbull, S., Ralph, C., West, E., Scott, K., Harrington, K., . . . Melcher, A. (2015). Talimogene laherparepvec in the treatment of melanoma. *Expert Opin Biol Ther*, 15(10), 1517-1530.
- Bar-Eli, N., Giloh, H., Schlesinger, M., & Zakay-Rones, Z. (1996). Preferential cytotoxic effect of Newcastle disease virus on lymphoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 122(7), 409-415.

- Basu, S., Kwee, T. C., Surti, S., Akin, E. A., Yoo, D., & Alavi, A. (2011). Fundamentals of PET and PET/CT imaging. *Ann N Y Acad Sci*, 1228, 1-18. doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06077.x
- Beetz, A., Julius, H., Turner, D., & Kotrschal, K. (2012). Effects of social support by a dog on stress modulation in male children with insecure attachment. *Front Psychol*, 3, 352. doi:10.3389/fpsyg.2012.00352
- Beetz, A., Uvnas-Moberg, K., Julius, H., & Kotrschal, K. (2012). Psychosocial and psychophysiological effects of human-animal interactions: the possible role of oxytocin. *Front Psychol*, 3, 234. doi:10.3389/fpsyg.2012.00234
- Biswas, M., Johnson, J. B., Kumar, S. R., Parks, G. D., & Elankumarana, S. (2012). Incorporation of host complement regulatory proteins into Newcastle disease virus enhances complement evasion. *J Virol*, 86(23), 12708-12716. doi:10.1128/JVI.00886-12
- Bluming, A. Z., & Ziegler, J. L. (1971). Regression of Burkitt's lymphoma in association with measles infection. *Lancet*, 2(7715), 105-106.
- Board, P. D. Q. A. T. E. (2002). Adult Non-Hodgkin Lymphoma Treatment (PDQ(R)): Health Professional Version *PDQ Cancer Information Summaries*. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US).
- Bu, X. F., Wang, M. B., Zhang, Z. J., Zhao, Y. H., Li, M., & Yan, Y. L. (2015). Autophagy is involved in recombinant Newcastle disease virus (rL-RVG)-induced cell death of stomach adenocarcinoma cells in vitro. *Int J Oncol*, 47(2), 679-689. doi:10.3892/ijo.2015.3039
- Buijs, P. R., van Amerongen, G., van Nieuwkoop, S., Bestebroer, T. M., van Run, P. R., Kuiken, T., . . . van den Hoogen, B. G. (2014). Intravenously injected Newcastle disease virus in non-human primates is safe to use for oncolytic virotherapy. *Cancer Gene Ther*, 21(11), 463-471. doi:10.1038/cgt.2014.51
- Buijs, P. R., Verhagen, J. H., van Eijck, C. H., & van den Hoogen, B. G. (2015). Oncolytic viruses: From bench to bedside with a focus on safety. *Hum Vaccin Immunother*, 11(7), 1573-1584. doi:10.1080/21645515.2015.1037058
- Casteleyn, C., Sleeckx, N., De Spiegelaere, W., Heindryckx, F., Coulon, S., & Van Steenkiste, C. (2013). New therapeutic targets in veterinary oncology: man and dog definitely are best friends. *Veterinary journal (London, England: 1997)*, 195(1), 6-7.
- Cekanova, M., & Rathore, K. (2014). Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations. *Drug design, development and therapy*, 8, 1911-1922.
- Chen, C. Y., Senac, J. S., Weaver, E. A., May, S. M., Jelinek, D. F., Greipp, P., . . . Barry, M. A. (2011). Species D adenoviruses as oncolytics against B-cell cancers. *Clin Cancer Res*, 17(21), 6712-6722. doi:10.1158/1078-0432.ccr-11-0968
- Cuadrado-Castano, S., Sanchez-Aparicio, M. T., Garcia-Sastre, A., & Villar, E. (2015). The therapeutic effect of death: Newcastle disease virus and its antitumor potential. *Virus Res*. doi:10.1016/j.virusres.2015.07.001
- Eager, R. M., & Nemunaitis, J. (2011). Clinical development directions in oncolytic viral therapy. *Cancer Gene Ther*, 18(5), 305-317. doi:10.1038/cgt.2011.7



- Elankumaran, S., Chavan, V., Qiao, D., Shobana, R., Moorkanat, G., Biswas, M., & Samal, S. K. (2010). Type I interferon-sensitive recombinant newcastle disease virus for oncolytic virotherapy. *J Virol*, *84*(8), 3835-3844. doi:10.1128/JVI.01553-09
- Fabian, Z., Csatory, C. M., Szeberenyi, J., & Csatory, L. K. (2007). p53-independent endoplasmic reticulum stress-mediated cytotoxicity of a Newcastle disease virus strain in tumor cell lines. *J Virol*, *81*(6), 2817-2830. doi:10.1128/jvi.02490-06
- Fiola, C., Peeters, B., Fournier, P., Arnold, A., Bucur, M., & Schirmacher, V. (2006). Tumor selective replication of Newcastle disease virus: association with defects of tumor cells in antiviral defence. *Int J Cancer*, *119*(2), 328-338. doi:10.1002/ijc.21821
- Fleming, J. M., Creevy, K. E., & Promislow, D. E. (2011). Mortality in north american dogs from 1984 to 2004: an investigation into age-, size-, and breed-related causes of death. *J Vet Intern Med*, *25*(2), 187-198. doi:10.1111/j.1939-1676.2011.0695.x
- Fournier, P., Wilden, H., & Schirmacher, V. (2012). Importance of retinoic acid-inducible gene I and of receptor for type I interferon for cellular resistance to infection by Newcastle disease virus. *Int J Oncol*, *40*(1), 287-298. doi:10.3892/ijo.2011.1222
- Friedberg, J. W. (2011). Relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, *2011*, 498-505. doi:10.1182/asheducation-2011.1.498
- Fu, F., Zhao, M., Yang, Y. J., Tong, G. Z., Yang, B. F., Song, C., & Li, X. (2011). Antiproliferative effect of newcastle disease virus strain D90 on human lung cancer cell line A549. *Oncol Res*, *19*(7), 323-333.
- Geering, W. A., Penrith, M.-L., & Nyakahuma, D. (2001). *Manual on procedures for disease eradication by stamping out*.
- Gross, S. (1971). Measles and leukaemia. *Lancet*, *1*(7695), 397-398.
- Guan, J., Chan, M., Brooks, B. W., & Rohonczy, L. (2014). Inactivation of infectious bursal disease and Newcastle disease viruses at temperatures below 0 C using chemical disinfectants. *Avian Dis*, *58*(2), 249-254. doi:10.1637/10697-101713-Reg.1
- Guija de Arespachoga, A., Schwendenwein, I., & Weissenbock, H. (2007). Retrospective study of 82 cases of canine lymphoma in Austria based on the Working Formulation and immunophenotyping. *J Comp Pathol*, *136*(2-3), 186-192. doi:10.1016/j.jcpa.2007.01.009
- Hansen, A. E., McEvoy, F., Engelholm, S. A., Law, I., & Kristensen, A. T. (2011). FDG PET/CT imaging in canine cancer patients. *Vet Radiol Ultrasound*, *52*(2), 201-206. doi:10.1111/j.1740-8261.2010.01757.x
- Henson, M. S., Suter, S. E., von Messling, V. A., Cattaneo, R., & Fielding, A. K. (2005). 803. The Effects of Intratumoral Injection of a Replicating Morbillivirus in a Canine Model of Naturally Occurring Lymphoma. *Molecular Therapy*, *11*, S312-S312.

- Hotte, S. J., Lorence, R. M., Hirte, H. W., Polawski, S. R., Bamat, M. K., O'Neil, J. D., . . . Major, P. P. (2007). An optimized clinical regimen for the oncolytic virus PV701. *Clin Cancer Res*, *13*(3), 977-985. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1817
- Huang, C., Fan, X. H., Jiang, Y. H., Song, D. Z., Gao, L. Q., Huang, Q. G., & Lai, Z. P. (2009). [Anti-tumor effect of Newcastle disease virus strain D817 against nude mouse xenografts of human colon carcinoma]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, *31*(7), 490-494.
- Ito, D., Frantz, A. M., & Modiano, J. F. (2014). Canine lymphoma as a comparative model for human non-Hodgkin lymphoma: recent progress and applications. *Vet Immunol Immunopathol*, *159*(3-4), 192-201. doi:10.1016/j.vetimm.2014.02.016
- Jamal, M. H., Ch'ng, W. C., Yusoff, K., & Shafee, N. (2012). Reduced Newcastle disease virus-induced oncolysis in a subpopulation of cisplatin-resistant MCF7 cells is associated with survivin stabilization. *Cancer Cell Int*, *12*(1), 35. doi:10.1186/1475-2867-12-35
- Janke, M., Peeters, B., de Leeuw, O., Moorman, R., Arnold, A., Fournier, P., & Schirmacher, V. (2007). Recombinant Newcastle disease virus (NDV) with inserted gene coding for GM-CSF as a new vector for cancer immunogene therapy. *Gene Ther*, *14*(23), 1639-1649. doi:10.1038/sj.gt.3303026
- Koks, C. A., Garg, A. D., Ehrhardt, M., Riva, M., Vandenberk, L., Boon, L., . . . Van Gool, S. W. (2015). Newcastle disease virotherapy induces long-term survival and tumor-specific immune memory in orthotopic glioma through the induction of immunogenic cell death. *Int J Cancer*, *136*(5), E313-325. doi:10.1002/ijc.29202
- Krishnamurthy, S., Takimoto, T., Scroggs, R. A., & Portner, A. (2006). Differentially regulated interferon response determines the outcome of Newcastle disease virus infection in normal and tumor cell lines. *J Virol*, *80*(11), 5145-5155. doi:10.1128/JVI.02618-05
- Kumar, R., Tiwari, A. K., Chaturvedi, U., Kumar, G. R., Sahoo, A. P., Rajmani, R. S., . . . Kumar, S. (2012). Velogenic newcastle disease virus as an oncolytic virotherapeutics: in vitro characterization. *Appl Biochem Biotechnol*, *167*(7), 2005-2022. doi:10.1007/s12010-012-9700-1
- Lam, H. Y., Yeap, S. K., Rasoli, M., Omar, A. R., Yusoff, K., Suraini, A. A., & Alitheen, N. B. (2011). Safety and clinical usage of newcastle disease virus in cancer therapy. *J Biomed Biotechnol*, *2011*, 718710. doi:10.1155/2011/718710
- Laurie, S. A., Bell, J. C., Atkins, H. L., Roach, J., Bamat, M. K., O'Neil, J. D., . . . Lorence, R. M. (2006). A phase 1 clinical study of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, using two-step desensitization. *Clin Cancer Res*, *12*(8), 2555-2562. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2038
- Lawrence, J., Rohren, E., & Provenzale, J. (2010). PET/CT today and tomorrow in veterinary cancer diagnosis and monitoring: fundamentals, early results and future perspectives. *Vet Comp Oncol*, *8*(3), 163-187. doi:10.1111/j.1476-5829.2010.00218.x

- Lazar, I., Yaacov, B., Shiloach, T., Eliahoo, E., Kadouri, L., Lotem, M., . . . Ben-Yehuda, D. (2010). The oncolytic activity of Newcastle disease virus NDV-HUJ on chemoresistant primary melanoma cells is dependent on the proapoptotic activity of the inhibitor of apoptosis protein Livin. *J Virol*, *84*(1), 639-646. doi:10.1128/jvi.00401-09
- LeBlanc, A. K., Naik, S., Galyon, G. D., Jenks, N., Steele, M., Peng, K. W., . . . Russell, S. J. (2013). Safety studies on intravenous administration of oncolytic recombinant vesicular stomatitis virus in purpose-bred beagle dogs. *Hum Gene Ther Clin Dev*, *24*(4), 174-181. doi:10.1089/humc.2013.165
- Lee, M. S., Lee, A. R., Jung, M. A., Lee, I. H., Choi, J. H., Chung, H. W., . . . Eom, K. D. (2010). Characterization of physiologic 18F-FDG uptake with PET-CT in dogs. *Vet Radiol Ultrasound*, *51*(6), 670-673.
- Li, P., Chen, C. H., Li, S., Givi, B., Yu, Z., Zamarin, D., . . . Wong, R. J. (2011). Therapeutic effects of a fusogenic newcastle disease virus in treating head and neck cancer. *Head Neck*, *33*(10), 1394-1399. doi:10.1002/hed.21609
- MacDonald, V. S., Thamm, D. H., Kurzman, I. D., Turek, M. M., & Vail, D. M. (2005). Does L-asparaginase influence efficacy or toxicity when added to a standard CHOP protocol for dogs with lymphoma? *J Vet Intern Med*, *19*(5), 732-736.
- Mansour, M., Palese, P., & Zamarin, D. (2011). Oncolytic specificity of Newcastle disease virus is mediated by selectivity for apoptosis-resistant cells. *J Virol*, *85*(12), 6015-6023. doi:10.1128/JVI.01537-10
- McNicholas, J., Gilbey, A., Rennie, A., Ahmedzai, S., Dono, J. A., & Ormerod, E. (2005). Pet ownership and human health: a brief review of evidence and issues. *BMJ*, *331*(7527), 1252-1254. doi:10.1136/bmj.331.7527.1252
- Messa, C., Bettinardi, V., Picchio, M., Pelosi, E., Landoni, C., Gianolli, L., . . . Fazio, F. (2004). PET/CT in diagnostic oncology. *Q J Nucl Med Mol Imaging*, *48*(2), 66-75.
- Molouki, A., & Yusoff, K. (2012). NDV-induced apoptosis in absence of Bax; evidence of involvement of apoptotic proteins upstream of mitochondria. *Virology*, *9*, 179. doi:10.1186/1743-422x-9-179
- Morton, L. M., Wang, S. S., Devesa, S. S., Hartge, P., Weisenburger, D. D., & Linet, M. S. (2006). Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood*, *107*(1), 265-276. doi:10.1182/blood-2005-06-2508
- Niu, Z. S., Bai, F. L., Sun, T., Tian, H., Yin, J. C., Cao, H. W., . . . Ren, G. P. (2014). [Antitumor efficacy of the recombinant Newcastle disease virus rNDV-IL15 on melanoma models]. *Yao Xue Xue Bao*, *49*(3), 310-315.
- Organization, W. H. (2014). GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. *Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.[Links]*.
- Ostrander, E. A. (2012). Franklin H. Epstein Lecture. Both ends of the leash--the human links to good dogs with bad genes. *N Engl J Med*, *367*(7), 636-646. doi:10.1056/NEJMra1204453
- Panda, A., Huang, Z., Elankumaran, S., Rockemann, D. D., & Samal, S. K. (2004). Role of fusion protein cleavage site in the virulence of Newcastle disease virus. *Microb Pathog*, *36*(1), 1-10.

- Patel, B., Dey, A., Ghorani, E., Kumar, S., Malam, Y., Rai, L., . . . Fielding, A. K. (2011). Differential cytopathology and kinetics of measles oncolysis in two primary B-cell malignancies provides mechanistic insights. *Mol Ther*, *19*(6), 1034-1040. doi:10.1038/mt.2011.44
- Pecora, A. L., Rizvi, N., Cohen, G. I., Meropol, N. J., Sterman, D., Marshall, J. L., . . . Lorence, R. M. (2002). Phase I trial of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, in patients with advanced solid cancers. *J Clin Oncol*, *20*(9), 2251-2266.
- Perozo, F., Merino, R., Afonso, C., Villegas, P., & Calderon, N. (2008). Biological and phylogenetic characterization of virulent Newcastle disease virus circulating in Mexico. *Avian diseases*, *52*(3), 472-479.
- Puhler, F., Willuda, J., Puhmann, J., Mumberg, D., Romer-Oberdorfer, A., & Beier, R. (2008). Generation of a recombinant oncolytic Newcastle disease virus and expression of a full IgG antibody from two transgenes. *Gene Ther*, *15*(5), 371-383. doi:10.1038/sj.gt.3303095
- Reed, L. J. M., H. (1983). A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hygiene*, *27*, 493-497.
- Regan, D., Guth, A., Coy, J., & Dow, S. (2016). Cancer immunotherapy in veterinary medicine: Current options and new developments. *Vet J*, *207*, 20-28. doi:10.1016/j.tvjl.2015.10.008
- Regan, R. C., Kaplan, M. S., & Bailey, D. B. (2013). Diagnostic evaluation and treatment recommendations for dogs with substage-a high-grade multicentric lymphoma: results of a survey of veterinarians. *Vet Comp Oncol*, *11*(4), 287-295. doi:10.1111/j.1476-5829.2012.00318.x
- Rowell, J. L., McCarthy, D. O., & Alvarez, C. E. (2011). Dog models of naturally occurring cancer. *Trends Mol Med*, *17*(7), 380-388. doi:10.1016/j.molmed.2011.02.004
- Russell, S. J., Federspiel, M. J., Peng, K. W., Tong, C., Dingli, D., Morice, W. G., . . . Dispenzieri, A. (2014). Remission of disseminated cancer after systemic oncolytic virotherapy. *Mayo Clin Proc*, *89*(7), 926-933. doi:10.1016/j.mayocp.2014.04.003
- Schaapveld, M., Aleman, B. M., van Eggermond, A. M., Janus, C. P., Krol, A. D., van der Maazen, R. W., . . . van Leeuwen, F. E. (2015). Second Cancer Risk Up to 40 Years after Treatment for Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med*, *373*(26), 2499-2511. doi:10.1056/NEJMoa1505949
- Shen, W., Patnaik, M. M., Ruiz, A., Russell, S. J., & Peng, K. W. (2016). Immunovirotherapy with vesicular stomatitis virus and PD-L1 blockade enhances therapeutic outcome in murine acute myeloid leukemia. *Blood*, *127*(11), 1449-1458. doi:10.1182/blood-2015-06-652503
- Steiner, H. H., Bonsanto, M. M., Beckhove, P., Brysch, M., Geletneky, K., Ahmadi, R., . . . Herold-Mende, C. (2004). Antitumor vaccination of patients with glioblastoma multiforme: a pilot study to assess feasibility, safety, and clinical benefit. *J Clin Oncol*, *22*(21), 4272-4281. doi:10.1200/jco.2004.09.038
- Strober, W. (2001). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol*, Appendix 3, Appendix 3B. doi:10.1002/0471142735.ima03bs21

- Swerdllow, S., Campo, E., & Harris, N. L. (2008). *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*: France: IARC Press, 2008.
- Tzadok-David, Y., Metzkin-Eizenberg, M., & Zakay-Rones, Z. (1995). The effect of a mesogenic and a lentogenic Newcastle disease virus strain on Burkitt lymphoma Daudi cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, *121*(3), 169-174.
- Vail, D. M. (2013). Comparative oncology - the North American experience. *BMC Proc*, *7 Suppl 2*, K5. doi:10.1186/1753-6561-7-S2-K5
- Vezzali, E., Parodi, A. L., Marcato, P. S., & Bettini, G. (2010). Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non-Hodgkin lymphoma according to the WHO. *Vet Comp Oncol*, *8*(1), 38-49. doi:10.1111/j.1476-5829.2009.00201.x
- Walter, R. J., Attar, B. M., Rafiq, A., Tejaswi, S., & Delimata, M. (2012). Newcastle disease virus LaSota strain kills human pancreatic cancer cells in vitro with high selectivity. *JOP*, *13*(1), 45-53.
- Wang, Y. J., Song, C., Li, X. H., & Zhang, J. B. (2011). [Roles of Newcastle disease virus in human acute monocytic leukemia in vitro and in vivo]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, *13*(2), 149-152.
- Washburn, B., Weigand, M. A., Grosse-Wilde, A., Janke, M., Stahl, H., Rieser, E., . . . Walczak, H. (2003). TNF-related apoptosis-inducing ligand mediates tumoricidal activity of human monocytes stimulated by Newcastle disease virus. *J Immunol*, *170*(4), 1814-1821.
- Wei, D., Li, Q., Wang, X. L., Wang, Y., Xu, J., Feng, F., . . . Bian, H. (2015). Oncolytic Newcastle disease virus expressing chimeric antibody enhanced anti-tumor efficacy in orthotopic hepatoma-bearing mice. *J Exp Clin Cancer Res*, *34*, 153. doi:10.1186/s13046-015-0271-1
- Wilden, H., Fournier, P., Zawatzky, R., & Schirmacher, V. (2009). Expression of RIG-I, IRF3, IFN-beta and IRF7 determines resistance or susceptibility of cells to infection by Newcastle Disease Virus. *Int J Oncol*, *34*(4), 971-982.
- Wilden, H., Schirmacher, V., & Fournier, P. (2011). Important role of interferon regulatory factor (IRF)-3 in the interferon response of mouse macrophages upon infection by Newcastle disease virus. *Int J Oncol*, *39*(2), 493-504. doi:10.3892/ijo.2011.1033
- Wong, H. H., Lemoine, N. R., & Wang, Y. (2010). Oncolytic Viruses for Cancer Therapy: Overcoming the Obstacles. *Viruses*, *2*(1), 78-106. doi:10.3390/v2010078
- Wu, Y., Yan, S., Lv, Z., Chen, L., Geng, J., He, J., . . . Li, D. (2014). Recombinant Newcastle disease virus Anhinga strain (NDV/Anh-EGFP) for hepatoma therapy. *Technol Cancer Res Treat*, *13*(2), 169-175. doi:10.7785/tcrt.2012.500356
- Yaacov, B., Eliahoo, E., Lazar, I., Ben-Shlomo, M., Greenbaum, I., Panet, A., & Zakay-Rones, Z. (2008). Selective oncolytic effect of an attenuated Newcastle disease virus (NDV-HUJ) in lung tumors. *Cancer Gene Ther*, *15*(12), 795-807. doi:10.1038/cgt.2008.31

- Zamarin, D., Vigil, A., Kelly, K., Garcia-Sastre, A., & Fong, Y. (2009). Genetically engineered Newcastle disease virus for malignant melanoma therapy. *Gene Ther*, 16(6), 796-804. doi:10.1038/gt.2009.14
- Zhao, H., Janke, M., Fournier, P., & Schirmmacher, V. (2008). Recombinant Newcastle disease virus expressing human interleukin-2 serves as a potential candidate for tumor therapy. *Virus Res*, 136(1-2), 75-80. doi:10.1016/j.virusres.2008.04.020

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### TABLAS

- Tabla 1.** Primers empleados para la detección del NDV-MLS por RT-PCR punto final.....Pag. 38
- Tabla 2.** Valores estandarizados de captación máxima ( $SUV_{max}$ ) de  $^{18}F$ FDG en tejidos de 3 perros sanos.....Pag. 51

### FIGURAS

- Figura 1.** Neoplasias malignas con origen en el linfocito B.....Pag. 10
- Figura 2.** Principales tipos de cáncer entre los hispanos, 2012.....Pag. 11
- Figura 3.** Porcentaje de muertes en perros adultos por proceso fisiopatológico.....Pag. 12
- Figura 4.** Potencial traslacional del perro como modelo espontáneo de cáncer.....Pag. 13
- Figura 5.** Estructura del virus de Newcastle.....Pag. 15
- Figura 6.** Estudio de PET/CT en un perro sano .....Pag. 26
- Figura 7.** Linfoma canino .....Pag. 30
- Figura 8.** Fotografía electrónica de transmisión del NDV-MLS en células linfoides neoplásica.....Pag. 31
- Figura 9.** Citotoxicidad del esquema CHOP en células SU-DHL-4.....Pag. 41

- Figura 10.** Citotoxicidad de CHOP 100x y virus NDV-MLS a distintas MOI, 48 y 72 horas post-tratamiento.....Pag. 42
- Figura 11.** Citotoxicidad del NDV-MLS en células linfoides humanas malignas (SU-DHL-4) y en células primarias derivadas de linfoma canino.....Pag. 44
- Figura 12.** Citotoxicidad del NDV-MLS en células linfoides sanas y cancerosas de perro y humano.....Pag. 45
- Figura 13.** Citotoxicidad del NDV-MLS en células mononucleares de sangre periférica de origen humano y canino.....Pag. 46
- Figura 14.** Efecto del NDV-MLS sobre células CD19 positivas de origen humano.....Pag. 47
- Figura 15.** RT-PCR puto final de tejidos caninos post-mortem.....Pag. 48
- Figura 16.** Tinciones de Inmunohistoquímica (IHQ) con un anticuerpo policlonal de conejo, contra la proteína HN del virus de Newcastle.....Pag. 49
- Figura 17.** Imagen PET/CT de perro con linfoma.....Pag. 50

## ABREVIATURAS Y SIGLAS

**APC.** Alofococianina

**APMV-I.** Paramixovirus aviar serotipo I

**CD.** Cluster de diferenciación

**CHOP.** Acrónimo de los fármacos de quimioterapia: Ciclofosfamida, Hidroxi-aunorubicina, Oncovin (Vincristina) y Prednisona

**CMN.** Centro Médico Nacional

**CT.** Tomografía Computarizada, por sus siglas en inglés

**DMSO.** Dimetilsulfóxido

**F.** Proteína de fusión

**<sup>18</sup>FDG.** 18-fluoro-2-deoxi-D-glucosa

**FITC.** Isotiocianato de fluoresceína

**HN.** Hemoaglutinina-neuraminidasa

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Peróxido de hidrógeno

**IFN.** Interferón

**IHQ.** Inmunohistoquímica

**IL.** Interleucina  
**IP.** Ioduro de propidio  
**IRF.** Factor regulador de Interferón  
**L.** Polimerasa larga  
**M.** Proteína de matriz  
**mCi.** Microcuries  
**MDCK.** Células renales bovinas Madin-Darby  
**MOI.** Multiplicidades de infección  
**MSP.** Células mononucleares de sangre periférica  
**NDV.** Virus de la enfermedad de Newcastle  
**NIS.** Simportador de yoduro de sodio  
**NP.** Nucleoproteína  
**NK.** Células asesinas naturales, por sus siglas en inglés  
**OMS.** Organización Mundial de la Salud  
**P.** Fosfoproteína  
**pb.** Pares de bases  
**PET.** Tomografía por Emisión de Positrones, por sus siglas en inglés  
**pH.** Potencial de iones hidrógeno  
**RIG-1.** Gen inducible de ácido retinoico-I  
**RNA.** Ácido ribonucleico  
**RT-PCR.** Reacción en cadena de polimerasa-transcripción reversa  
**SDF™.** Espuma descontaminante de superficies, por su nombre en inglés  
**SEM.** Error estándar de la media  
**SFB.** Suero fetal bovino  
**SPF.** Libre de patógenos específicos  
**TA.** Temperatura ambiente  
**TBST.** Solución tween 20-tris-buffer salino.  
**TCID<sub>50</sub>.** Dosis infectivas media en cultivo celular.  
**TRAIL.** Ligando inductor de apoptosis relacionada con el factor de necrosis tumoral.  
**UFP.** Unidades formadoras de placas.  
**UIMEO.** Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas