

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

TESIS

**“Estudio de la actividad antitumoral de una vacuna
atenuada recombinantemente del virus de Newcastle”**

PRESENTA

M. en C. Oscar Antonio Ortega Rivera

**PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

TUTORES

**Dra. Eva María Salinas Miralles
Dr. José Luis Quintanar Stephano**

**MIEMBRO DEL COMITÉ TUTORIAL
Dra. Susana Del Toro Arreola**

Aguascalientes, Ags.

Diciembre 2017

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE AGUASCALIENTES

M en C José de Jesús Ruiz Gallegos
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como Tutores designados del estudiante **OSCAR ANTONIO ORTEGA RIVERA** con ID 69346 quien realizó la tesis titulada: **ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE UNA VACUNA ATENUADA RECOMBINANTEMENTE DEL VIRUS DE NEWCASTLE**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla, así como, continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, nos permitimos enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., 29 de noviembre de 2017.

Dra. Eva María Salinas Miralles
Co-Tutora de Tesis

Dr. José Luis Quintanar Stephano
Co-Tutor de Tesis

Dra. Susana Del Toro Arreola
Miembro del Comité Tutorial

c.c.p. - Interesado
c.c.p. - Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p. - Consejero Académico
c.c.p. - Secretario Técnico





**OSCAR ANTONIO ORTEGA RIVERA
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E.**

Estimado alumno:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **"ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE UNA VACUNA ATENUADA RECOMBINANTEMENTE DEL VIRUS DE NEWCASTLE."**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., a 30 de noviembre de 2017

"Se lumen proferre"

EL DECANO



M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS

c.c.p.- Archivo.

Antitumor and immunostimulatory activities of a genotype V recombinant attenuated veterinary Newcastle disease virus vaccine

OSCAR ANTONIO ORTEGA-RIVERA¹, J LUIS QUINTANAR², SUSANA DEL TORO-ARREOLA³,
ÁNGEL G ALPUCHE-SOLIS⁴, MAYRA J ESPARZA-ARAIZA⁴ and EVA SALINAS¹

¹Laboratory of Immunology, Department of Microbiology; ²Laboratory of Neurophysiology, Department of Physiology and Pharmacology, Basic Science Center, Autonomous University of Aguascalientes, Aguascalientes 20131, Aguascalientes;

³Laboratory of Immunology, Department of Physiology, CUCS, University of Guadalajara, Guadalajara 44340, Jalisco;

⁴Division of Molecular Biology, Potosinian Institute of Scientific and Technological Research, San Luis Potosí 78216, San Luis Potosí, Mexico

Received June 30, 2017; Accepted October 17, 2017

DOI: 10.3892/ol.2017.7387

Abstract. Antitumor conventional treatments including chemo/radiotherapy result in several side effects and non-specificity. Therapies including the use of oncolytic viruses, particularly the Newcastle disease virus (NDV), have emerged as an attractive alternative due to their capacity to kill cancer cells directly or through stimulation of the immune system. In the present study, a commercial vaccine composed of a recombinant attenuated NDV strain P05 (rNDV-P05) was assessed for antitumor and immunostimulatory activity. Firstly, hemagglutination activity was evaluated at different pH and temperature conditions. Then, cancer cell lines and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were co-cultured with or without rNDV-P05 and cytoplasmic nucleosomes were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as an apoptosis indicator. Antitumor cytokines produced by PBMC in response to the virus were analyzed by ELISA and reverse transcription quantitative polymerase chain reaction. Characterization of rNDV-P05 indicates that the virus is slightly sensible to acid and basic pH, and stable at temperatures no greater than 42°C. The majority of cell lines developed apoptosis in co-culture with rNDV-P05 in a dose-time dependent manner. The highest level of HeLa, HCC1954 and HepG2 cell apoptosis was at 48 h/50 hemagglutination units (HU), and HL-60 was 24 h/50 HU. A549 cell line and PBMC did not show sensitivity to apoptosis by the virus. PBMC from healthy

donors stimulated with the rNDV-P05 increased significantly the levels of interferon (IFN)- α , IFN- γ , tumor necrosis factor (TNF)- α and soluble TNF-related apoptosis-inducing ligand in culture supernatants, as well as their mRNA expression. These results demonstrate that the pro-apoptotic effect of rNDV-P05 and its magnitude is specific to particular tumor cell lines and is not induced on PBMC; and the virus stimulates the expression of several key antitumor cytokines. This study promotes the use of rNDV-P05 in an alternate application of different viral strains during virotherapy with NDV.

Introduction

According to the World Health Organization cancer is a broad term for a large group of diseases that can affect any part of the body. It is caused by transformation of normal to malignant cells that behave unusual and grow beyond their usual boundaries. It is the second leading cause of death globally, and was responsible for 8.8 million deaths in 2015 (1). Conventional chemo and radiotherapy have many adverse effects and fail to cure many types of cancer in humans, thus alternative therapies to treat cancer patients have become more popular since late last century (2). Among these therapies the use of oncolytic viruses, which have tropism to malignant cells but not to normal cells, has been gaining field during the last decades (3) and even a FDA-approved virotherapy is already available since 2015 (IMLYGIC™; Amgen, Inc., Thousand Oaks, CA, USA). Oncolysis induced by these viruses is mostly an immunogenic type of cancer cell death that includes immunogenic apoptosis, necrosis and autophagic cell death (4). As consequence, oncolytic virus induces a potent post-oncolytic antitumor activity that is considered crucial for its efficient therapeutic activity (5).

The Newcastle disease virus (NDV) is one of the various species of viruses that are under clinical evaluation as vector for oncolytic tumor, gene and immune stimulation therapies (3). It is member of the *Avulavirus* genus in the Paramyxoviridae family (6) and possesses a 15,186 nucleotide negative single

Correspondence to: Dr Eva Salinas, Laboratory of Immunology, Department of Microbiology, Basic Science Center, Autonomous University of Aguascalientes, 940 Avenue Universidad, Aguascalientes 20131, Aguascalientes, Mexico
E-mail: emsalin@correo.uaa.mx

Key words: Newcastle disease virus, antitumor activity, immunostimulatory activity, genotype V, strain P05

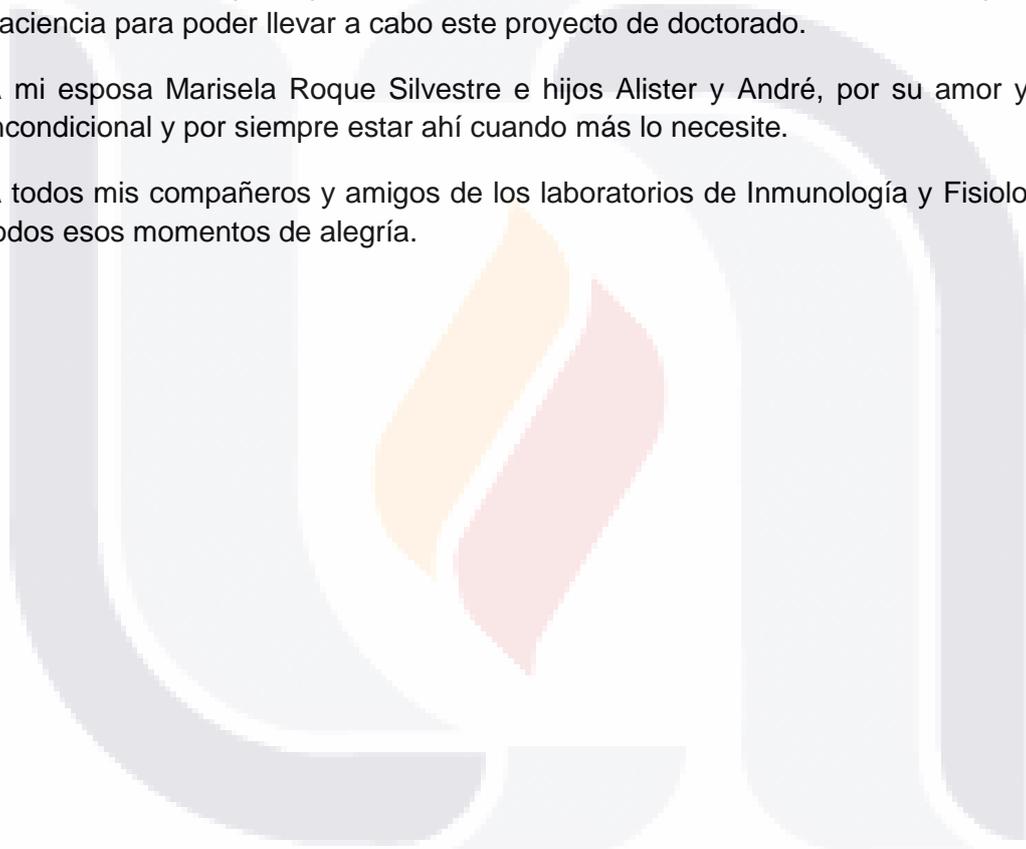
AGRADECIMIENTOS.

Quiero agradecer en primera instancia al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado la beca con número de registro 362510 para cursar el programa Doctorado en Ciencias Biológicas modalidad tradicional. Así también, por haber proporcionado la Beca Mixta para realizar una estancia de investigación en el Instituto Fraunhofer-IME en Alemania. De igual manera por el apoyo económico mediante el proyecto bilateral México-Alemania número 207977.

A la Dra. Eva María Salinas Miralles, a la Dra. Susana Del Toro Arreola y al Dr. José Luis Quintanar Stephan por haberme brindado su amistad, confianza, comprensión y paciencia para poder llevar a cabo este proyecto de doctorado.

A mi esposa Marisela Roque Silvestre e hijos Alister y André, por su amor y apoyo incondicional y por siempre estar ahí cuando más lo necesite.

A todos mis compañeros y amigos de los laboratorios de Inmunología y Fisiología por todos esos momentos de alegría.



INDICE GENERAL

| | |
|--|----|
| RESUMEN..... | 6 |
| ABSTRACT | 7 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 8 |
| 1.1- Virus de la enfermedad de Newcastle (NDV)..... | 8 |
| 1.2- Producción recombinante de las glicoproteínas Hemaglutinin-Neuraminidasa (HN) y de Fusión (F) | 11 |
| 1.3- Inmunobiología del Cáncer..... | 14 |
| 1.4- Interacciones del Cáncer con el Sistema Inmune Innato..... | 18 |
| 1.5- Viroterapia | 24 |
| 1.6- Mecanismos de oncolisis mediada por NDV | 25 |
| 1.7- Experiencia clínica con diferentes cepas de NDV | 30 |
| 1.8- Caracterización molecular de la cepa mexicana APMV1/chicken/Mexico/P05/2005 | 39 |
| 2- JUSTIFICACIÓN..... | 41 |
| 3- HIPÓTESIS..... | 43 |
| 4- OBJETIVO GENERAL..... | 43 |
| 4.1- Objetivos Particulares..... | 43 |
| 5- METODOLOGÍA..... | 44 |
| 5.1- Expresión transitoria de la proteína HN en hojas cosechadas de <i>Nicotiana benthamiana</i> | 44 |
| 5.2- Extracción, purificación y cuantificación de la proteína HN expresada..... | 45 |
| 5.3- Precipitación de proteínas | 46 |
| 5.4- Separación microsomal por centrifugación | 46 |
| 5.5- Expresión y purificación de la proteína HN en plantas completas de <i>N. benthamiana</i> | 47 |
| 5.6- Virus recombinante NDV cepa P05 (rNDV-P05) | 51 |
| 5.7- Ensayo de hemaglutinación..... | 52 |
| 5.8- Identificación de las proteínas virales | 52 |
| 5.9- Cultivo de líneas celulares..... | 52 |
| 5.10- Detección de apoptosis..... | 53 |
| 5.11- Estimulación de PBMC y cuantificación de citocinas | 54 |
| 5.12- Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa-mediante transcripción reversa (RT-qPCR)..... | 55 |

| | |
|---|-----|
| 5.13- Cultivo de la linea celular 4T1 para el modelo de cáncer de mama. | 57 |
| 5.14- Inducción del tumor y seguimiento de su crecimiento | 57 |
| 5.15- Tratamiento <i>in vivo</i> con rNDV-P05..... | 58 |
| 5.16- Determinación del peso del tumor, índice del bazo y metástasis en pulmón... | 59 |
| 5.17- Análisis estadístico | 60 |
| 6- RESULTADOS..... | 61 |
| 6.1- Expresión, purificación y evaluación de la actividad de la proteína HN de hojas de <i>N. benthamiana</i> | 61 |
| 6.2- Precipitación de proteínas | 62 |
| 6.3- Separación microsomal por centrifugación | 64 |
| 6.4- Transformación de <i>Agrobacterium</i> para infiltración en plantas completas de <i>N. benthamiana</i> | 66 |
| 6.5- Cultivo de <i>Agrobacterium</i> , infiltración de <i>N. benthamiana</i> y muestreo..... | 67 |
| 6.6- Análisis de expresión de HN nativa y HN-tag en <i>N. benthamiana</i> infiltradas..... | 68 |
| 6.7- Purificación de HN-tag por IMAC. | 69 |
| 6.8- Actividad hemaglutinante de la proteína HN-tag. | 72 |
| 6.9- Caracterización de rNDV-P05..... | 72 |
| 6.10- El rNDV-P05 induce apoptosis en células HeLa, HCC1954, HL-60 y HepG2, pero no en células A549 y PBMC. | 74 |
| 6.11- El rNDV-P05 induce liberación de citocinas por PBMC..... | 77 |
| 6.12- Respuesta temprana de citocinas a nivel de ARNm inducido por rNDV-P05 en PBMC. | 77 |
| 6.13- Efecto antitumoral de rNDV-P05 <i>in vivo</i> | 79 |
| 7- DISCUSIÓN..... | 89 |
| 8- CONCLUSIÓN. | 98 |
| REFERENCIAS. | 99 |
| GLOSARIO..... | 113 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1. COMPOSICIÓN MOLECULAR DEL PARAMIXOVIRUS NDV. | 9 |
| FIGURA 2. ESTRUCTURA DEL ECTODOMINIO HN DEL NDV. | 11 |
| FIGURA 3. LAS TRES FASES DE LA INMUNOEDICIÓN DEL CÁNCER. | 17 |
| FIGURA 4. EL RECONOCIMIENTO DIRECTO DEL CÁNCER POR EL SISTEMA INMUNE INNATO. . | 23 |
| FIGURA 5. MECANISMOS DE LOS EFECTOS ANTITUMORALES REGULADOS POR NDV. | 29 |
| FIGURA 6. ESTRATEGIAS EMPLEADAS PARA POTENCIAR LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE (NDV) MEDIANTE INGENIERÍA GENÉTICA. . | 38 |
| FIGURA 7. ANALISIS FILOGENÉTICO DEL GENOMA PARCIAL O COMPLETO DE DIFERENTES CEPAS DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE (NDV). | 40 |
| FIGURA 8. ESQUEMA REPRESENTATIVO DEL PROCESO DE AGROINFILTRACIÓN. | 45 |
| FIGURA 9. ESQUEMA REPRESENTATIVO, NO A ESCALA, DE LAS CONSTRUCCIONES UTILIZADAS. | 47 |
| FIGURA 10. ESQUEMA REPRESENTATIVO DEL MODELO TUMORAL 4T1 EN RATÓN BALB/C. . | 59 |
| FIGURA 11. ENSAYO DE HEMAGLUTINACIÓN PARA LA HN PRODUCIDA EN HOJAS COSECHADAS DE TABACO. | 62 |
| FIGURA 12. PRECIPITACIÓN DE LA PROTEÍNA HN POR EL MÉTODO DE METANOL/CLOROFORMO. | 63 |
| FIGURA 13. ENSAYO DE HEMAGLUTINACIÓN PARA LA HN PURIFICADA POR PRECIPITACIÓN. | 64 |
| FIGURA 14. EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LA PROTEÍNA HN EN DIFERENTES FRACCIONES CELULARES. | 65 |
| FIGURA 15. CONCENTRACIÓN DE LA PROTEÍNA HN EN EL EXTRACTO DE <i>NICOTIANA BENTHAMIANA</i> | 66 |
| FIGURA 16. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) DE COLONIAS POSITIVAMENTE TRANSFORMADAS DE <i>A. TUMEFACIENS</i> | 67 |
| FIGURA 17. IMÁGENES DE PLANTAS DE <i>N. BENTHAMIANA</i> INFILTRADAS Y ANALIZADAS EN DIFERENTES DÍAS POST INFILTRACIÓN (DPI). | 67 |
| FIGURA 18. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN Y REACTIVIDAD DE LAS PROTEÍNAS DE INTERÉS MEDIANTE DOT BLOT. | 68 |
| FIGURA 19. WESTERN BLOT DE LAS FRACCIONES DE LA PURIFICACIÓN POR IMAC DE LA PROTEÍNA HN-TAG. | 70 |
| FIGURA 20. ANALISIS MEDIANTE SDS-PAGE Y WESTERN BLOT DE LA PROTEINA HN-TAG PURIFICADA POR IMAC. | 71 |
| FIGURA 21. ENSAYO DE HEMAGLUTINACIÓN PARA LA PROTEÍNA HN-TAG. | 72 |

FIGURA 22. CARACTERIZACION DE LAS PROTEINAS Y ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE RNDV-P05.....73

FIGURA 23. EFECTO DEL PH SOBRE LA ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DEL NDV.....74

FIGURA 24. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DEL NDV SOBRE LAS LÍNEAS TUMORALES.....76

FIGURA 25. ACTIVIDAD INMUNOESTIMULADORA DE RNDV-P05 SOBRE PBMC EVALUADAS POR ELISA.....78

FIGURA 26. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS EN PBMC ESTIMULADA CON RNDV-P05 MEDIANTE PCR CUANTITATIVA.79

FIGURA 27. EFECTO ANTITUMORAL DE RNDV SOBRE EL CRECIMIENTO DE TUMORES DE MAMA 4T1 EN RATONES BALB/C.....81

FIGURA 28. EFECTO DE RNDV-P05 SOBRE LA LÍNEA TUMORAL 4T1 EN RATÓN BALB/C Y EL PESO CORPORAL.....83

FIGURA 29. EFECTO INHIBITORIO *IN VIVO* DE RNDV-P05 SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA LÍNEA TUMORAL 4T1 EN RATÓN BALB/C.85

FIGURA 30. EFECTO DE RNDV-P05 EN EL TAMAÑO DE TUMORES DE LA LÍNEA 4T1 INDUCIDOS EN RATONES BALB/C.86

FIGURA 31. BAZOS REPRESENTATIVOS DE RATONES BALB/C INDUCIDOS CON TUMOR DE MAMA 4T1.87

FIGURA 32. CULTIVO PRIMARIO DE TEJIDO PULMONAR PARA LA DETECCIÓN DE COLONIAS CLONOGÉNICAS METASTÁSICAS DE CELULAS 4T1.....88

INDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| TABLA 1. PRODUCCIÓN DE VACUNAS DE SUBUNIDAD BASADAS EN LAS PROTEÍNAS DE SUPERFICIE DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE (NDV)..... | 13 |
| TABLA 2. OLIGONUCLEOTIDOS USADOS PARA CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESION DE DIFERENTES GENES DE CITOCINAS. | 56 |
| TABLA 3. CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE LA ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE RNDV-P05 MEDIANTE ENSAYO DE HEMAGLUTINACIÓN. | 74 |



RESUMEN.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, el cáncer es la principal causa de muerte alrededor del mundo, con 8.8 millones de muertes (13% de todas las muertes de 2014). El cáncer es el resultado ya sea por el decrecimiento en la muerte celular o por un incremento en la replicación celular. La limitada eficacia de los quimioterapéuticos, que pueden también tener efectos secundarios indeseables hace su uso virtualmente inaccesible en países subdesarrollados.

Los virus oncolíticos, tienen la habilidad de matar células cancerígenas sin dañar las células normales y han sido usados en el tratamiento contra el cáncer desde inicios de los 50's. Estos virus tienen una fuerte actividad antitumoral e inmunoestimuladora tales como el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV). El mecanismo oncolítico del NDV esta mediado en parte por las proteínas de la membrana, la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y la de fusión (F). Es por ello que nos enfocamos en evaluar dos puntos importantes: primero si la glicoproteína HN del NDV, puede ser expresada y purificada de un sistema de producción de proteínas basado en plantas de *Nicotiana benthamiana*; segundo, determinar si una versión recombinante del virus, generado a partir de una cepa mexicana (rNDV-P05), posee capacidad antitumoral e inmunoestimuladora, tanto *in vitro* como *in vivo*.

La proteína HN expresada en hojas cosechadas de *N. benthamiana* posee actividad biológica, pero muy bajo rendimiento de purificación. Mientras que la precipitación con metanol/cloroformo, es mayor pero pierde su actividad biológica. La filtración reduce la concentración de la proteína HN en la muestra al localizarse en fracciones microsomales y debris celular. Se logró expresar la proteína HN-tag en plantas completas de *N. benthamiana* y se purificó por IMAC, sin embargo no mostró actividad hemaglutinante.

El rNDV-P05 mostró una actividad antitumoral contra cuatro de cinco líneas probadas y estimuló en PBMC la expresión de citocinas antitumorales (TNF- α , IFN- α , TRAIL e IFN- γ). Además mostró ser segura en células normales como en PBMC. En un modelo ortotópico singénico de cáncer de mama, inducido con células 4T1 en ratón Balb/c, rNDV-P05 mostró que la administración por vía sistémica es significativamente menor sobre el tamaño del tumor primario y la metástasis. El modelo de administración intratumoral con rNDV-P05 fue inefectivo para todos los parámetros evaluados.

ABSTRACT.

According to the World Health Organization, cancer is the leading cause of death in the world, with 8.8 million deaths (13% of all deaths in 2014). Cancer is the result of either a decrease in cell death or an increase in cell replication. The limited efficacy of chemotherapeutics, which can also have undesirable side effects that makes their use virtually inaccessible in underdeveloped countries.

Oncolytic viruses have the ability to kill cancer cells without damaging normal cells and have been used in the treatment of cancer since the early 50's. These viruses have a strong antitumor and immunostimulatory activity such as the Newcastle disease virus (NDV). The oncolytic mechanism of NDV is mediated in part by membrane proteins, hemagglutinin-neuraminidase (HN) and fusion (F). That is why we focus on evaluating two important points: first, whether the HN glycoprotein of NDV can be expressed and purified from a protein production system based on *Nicotiana benthamiana* plants; second, to determine whether a recombinant version of the virus, generated from a Mexican strain (rNDV-P05), has antitumor and immunostimulatory capacity, both *in vitro* and *in vivo*.

The HN protein expressed in harvested leaves of *N. benthamiana* possesses biological activity, but very low yield of purification. While precipitation with methanol / chloroform, it is greater but loses its biological activity. The filtration reduces the concentration of the HN protein in the sample when located in microsomal and cellular debris fractions. The HN-tag protein was expressed in whole plants of *N. benthamiana* and purified by IMAC, however, it did not show haemagglutinating activity.

rNDV-P05 showed antitumor activity against four out of five tested lines and stimulated in PBMC the expression of antitumor cytokines (TNF- α , IFN- α , TRAIL and IFN- γ). It also showed to be safe in normal cells as in PBMC. In a syngeneic orthotopic model of breast cancer, induced with 4T1 cells in Balb/c mice, rNDV-P05 showed that systemic administration offers significant reduction on the primary tumor and metastasis. The intratumoral administration model with rNDV-P05 was ineffective for all parameters evaluated.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

1. INTRODUCCIÓN.

1.1- Virus de la enfermedad de Newcastle (NDV)

La enfermedad de Newcastle es causada por los virus del serotipo paramixovirus aviar 1 (APMV-1). Estos virus, llamados APMV-1 o virus NDV, son miembros del género Avulavirus, subfamilia Paramyxovirinae, familia Paramyxoviridae, orden Mononegavirales (Aldous et al 2003; Le Bayon et al 2012). Las cepas de NDV o APMV-1 se clasifican en tres patotipos conforme a su virulencia en los pollos. Las cepas lentogénicas son menos virulentas, las mesogénicas son moderadamente virulentas, y las más virulentas son las velogénicas. La mayoría de las cepas se agrupan en los extremos de la virulencia y son bien lentogénica o velogénica. Los patotipos velogénicos se pueden dividir en neurotrópico, que normalmente se asocia con signos respiratorios y neurológicos, y viscerotrópico, asociado con lesiones intestinales (OIE 2014).

Como la mayoría de los miembros de la familia Paramyxoviridae, el NDV tiene un genoma de ARN de cadena simple con un tamaño de alrededor de 15,186, 15,192 y 15,198 nucleótidos, no segmentado, de polaridad negativa protegida por la simetría helicoidal de la cápside y una envoltura lipoproteica con un patrón de proyecciones de 80 Angstroms de longitud, y donde se ubican los componentes antigénicos que dan la especificidad serológica. Su genoma codifica para al menos seis proteínas incluyendo la nucleoproteína (NP), la fosfoproteína (P), la proteína de matriz (M), la proteína de fusión (F), la proteína hemaglutinin-neuraminidasa (HN) y la ARN polimerasa (L) (Figura 1). El virión se compone de una nucleocápside estable que consiste de la proteína NP unida al ARN genómico y antigenómico (Seal et al 2005; Knipe y Hetsley 2001; Zhao y Peeters 2003; Flint et al 2007). Las proteínas P y L se unen al núcleo de la nucleocápside poco después de la síntesis para formar el complejo ribonucleoproteína (RNP). Este complejo de RNP se convierte en el molde para la transcripción por la proteína polimerasa L de ARN dependiente de ARN. La proteína L se une al ARN genómico en un sitio de entrada 3' en el complejo RNP y transcribe los seis genes de proteínas utilizando un mecanismo de arranque y parada. En este mecanismo la proteína L inicia la transcripción y libera el complejo RNP después de la transcripción de un número de nucleótidos a lo largo del gen que es siempre igual a un múltiplo de seis nucleótidos para la familia Paramyxoviridae. Este requisito de transcripción se conoce como la "regla de los seis" (Seal et al 2005; Zhao and Peeters 2003).

Las partículas virales miden 120 a 180 nm y en sus glicoproteínas de la envoltura se han identificado dos polipéptidos. El NDV tiene un peso molecular promedio de 500×10^6 Daltons, con una densidad en sacarosa de 1.18 a 1.20 g / ml. (Alexander 1991; Czeglédi et al 2006; De Leeuw y Peeters 1999). Las dos glicoproteínas de superficie, la F y la HN son objetivos importantes para la respuesta inmune del hospedero. Los anticuerpos contra la proteína F parecen ser importantes para prevenir la infección y la propagación del virus *in vivo*. Los principales determinantes antigénicos y epítomos que estimulan la producción de anticuerpos neutralizantes del virus se han determinado para las proteínas F (Toyoda et al 1988) y HN (Chambers et al 1988).

De hecho, hay pruebas serológicas para identificar el NDV, tales como las pruebas de hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación, basadas en la capacidad de la hemaglutinina de aglutinar eritrocitos de pollo y algunas otras especies animales. En la hemaglutinación el virus se adsorbe a los residuos de ácido siálico presentes en receptores celulares, lo que causa la aglutinación de eritrocitos, con la desadsorción posterior, debido a la digestión enzimática de los residuos de ácido siálico del receptor de la célula, por la neuraminidasa viral. El tiempo en el que la hemaglutinina del virus se destruye por el calor, es característico de cada cepa de NDV y es una propiedad que se puede utilizar para diferenciar entre cepas. El virus tiene una hemolisina que le permite producir diversos grados de hemólisis de los eritrocitos aglutinados. Su actividad hemolítica es promovida por procesos tales como la congelación, descongelación y diálisis (OIE 2014).

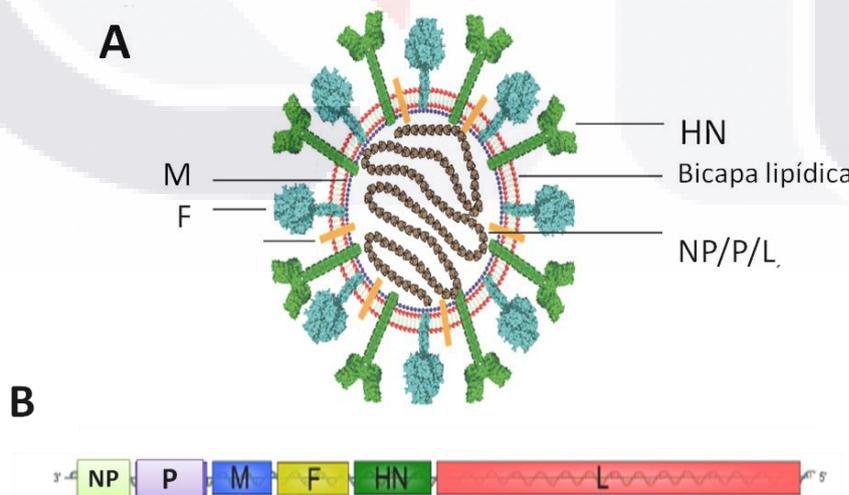


Figura 1. Composición molecular del paramixovirus NDV.

A) Representación esquemática de un virión del NDV, donde se observa el acomodo espacial de las diferentes elementos que constituyen el virión: nucleoproteína (NP), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), proteína de fusión (F), proteína hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y

ARN polimerasa (L). B) Representación esquemática de la organización genómica del NDV. No está a escala. Modificado de Le Bayon et al (2012); Chang et al (2012)

Como ya se mencionó, el virión del NDV contiene dos tipos de glicoproteínas en la superficie, la proteína F y la proteína HN (Saif et al 2008; Knipe y Hetsley 2001; Zanetti et al 2008). La proteína F es una glicoproteína de fusión de clase I que se sintetiza como una proteína integral de membrana de tipo I. Cuando se traduce la proteína, tres cadenas polipeptídicas idénticas se ensamblan en homotrímeros. Glicosilaciones se añaden a los homotrímeros después de la traducción, los cuales son biológicamente inactivos. Las proteasas del huésped deben escindir la proteína del precursor con el fin de que se convierta biológicamente activo.

La segunda glicoproteína de superficie es la HN (Figura 2). Esta proteína desempeña múltiples funciones en la entrada y salida viral, incluyendo la unión a receptores de ácido siálico, la activación de la proteína F para iniciar la fusión de membranas y la entrada del virus, y la escisión de ácido siálico (neuraminidasa) a partir de las cadenas de carbohidratos; así también, es capaz de estimular al sistema inmune (Hines y Miller 2012; Yuan et al 2011). Comúnmente tiene cinco sitios de N-glicosilación ubicados en los aminoácidos 120, 341, 433, 481, y 538 (Seal 2004). La proteína HN es una proteína de membrana de tipo II, con dominios transmembranales N-terminal (TM) seguido de una región de tallo y un dominio de cabeza globular C-terminal (Lamb y Parks 2007). Las proteínas de acoplamiento HN se cree forman tetrámeros en su forma activa y se encuentran en un subconjunto de los paramixovirus, incluyendo virus parainfluenza 5 (PIV5), virus de la parotiditis, virus NDV, virus Sendai, y virus parainfluenza de humanos (Lamb y Parks 2007; Lamb y Jardetzky 2007; Smith et al 2009; Crennell et al 2000). El dominio C-terminal de neuraminidasa (NA), obtenido por escisión proteolítica o por expresión del dominio NA solo, contiene el sitio de unión al receptor y la actividad de la neuraminidasa (Crennell et al 2000; Takimoto et al 2000; Yuan et al 2011 [Figura 2]).

El dominio del tallo de la proteína HN contiene determinantes de especificidad para la activación de la proteína F, afecta a la actividad de la neuraminidasa, y contribuye significativamente a la oligomerización de la proteína (Lamb y Parks de 2007; Smith et al 2009; Iorio et al 2009). Estudios mutacionales del tallo de la proteína HN han examinado los efectos sobre la fusión de membranas, la actividad NA, hemadsorción, la formación del complejo de la proteína F y la oligomerización (Stone-Hulslander y Morrison 1999; Gravel y Morrison 2003; Melanson y Iorio 2004; Melanson y Iorio 2006). Aunque las mutaciones en el tallo de la proteína HN pueden afectar tanto las actividades de NA y de fusión de membranas, no ha sido claro cómo se acoplan

estas dos funciones. Actualmente, un tallo con un haz de cuatro hélices (4HB) acoplado entre dos dímeros de dominio NA en el NDV ha sido revelado (Yuan et al 2011), lo que aclara el panorama sobre la base estructural de la actividad NA y de la promoción de fusión de membrana dependiente del tallo de la proteína HN (Figura 2).

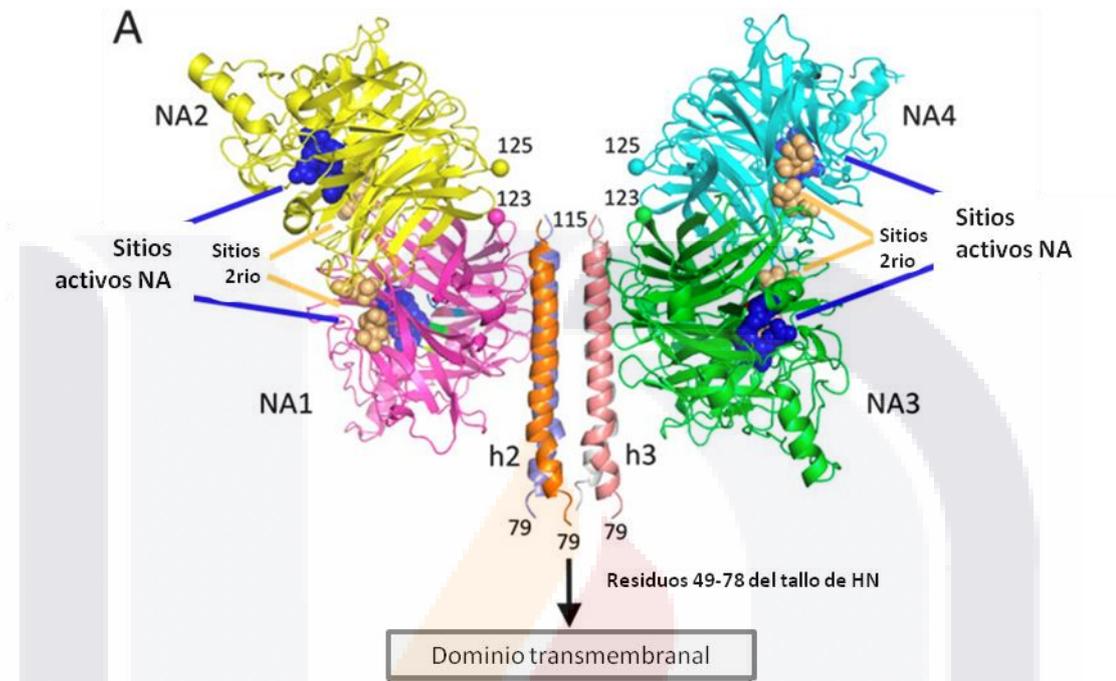


Figura 2. Estructura del ectodominio HN del NDV.

Dos dímeros de los dominios NDV HN NA flanquean la 4HB en el tallo. Los cuatro dominios de NA están etiquetados como NA1-NA4. Los sitios activos están marcados por tres residuos que se muestran como esferas azules CPK (E400, R415, y Y525) y etiquetados respectivamente. Los sitios de unión a ácido siálico secundarios están ubicados en las interfaces del dímero de dominio NA y están marcados por los residuos que se muestran como esferas naranjas CPK y marcados como "sitios 2rio". Los cuatro dominios de NA N-terminal, los residuos 123 y 125, se encuentran etiquetadas y se indica por sus átomos de CA que se muestran en formato de CPK coloreado por cadena. Las conexiones de la región N-terminal del tallo a los dominios HN TM y la membrana viral se indican también. Modificado de Yuan et al (2011). Abreviaturas: modelo Corey-Pauling-Koltun (CPK); neuraminidasa (NA); transmembranal (TM).

1.2- Producción recombinante de las glicoproteínas Hemaglutinin-Neuraminidasa (HN) y de Fusión (F)

Como ya se mencionó anteriormente, el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) posee dos tipos de glicoproteínas de envoltura, la HN y la F, las cuales cumplen en general la función de anclaje e internalización a la célula hospedante, respectivamente. En este sentido, es importante señalar que las glicoproteínas de envoltura, HN y F, han sido un objetivo relevante para su producción de manera

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

recombinante en diferentes sistemas de expresión (tabla 1), sobre todo con el fin de ser usadas como una vacuna de subunidad. Dentro de los sistemas que se enumeran en la tabla 1, es de gran interés resaltar los sistemas de expresión basados en plantas, ya que para el caso de la proteína HN, ésta fue un hito en el campo de la biotecnología vegetal, debido a que fue la primera vacuna recombinante, expresada en plantas, en ser aprobada para su comercialización (USDA, 2006).

Retomando los diferentes sistemas de expresión mencionados en la tabla 1, mucha ha sido la investigación que se ha generado en torno a la búsqueda de sistemas eficientes y económicos para la producción de vacunas o proteínas terapéuticas. Esto, como una alternativa a los sistemas tradicionales basados en huevos de gallina, cuya capacidad limitada de respuesta ante la demanda de grandes cantidades de vacunas o terapéuticos se vio evidenciada durante el brote del virus de la influenza H1N1 en 2009. Por ello, recientemente se ha volteado la atención de investigadores y emprendedores hacia las plantas como el candidato potencialmente más económico y seguro de producción. El potencial de los farmacéuticos hechos en plantas (PMP's), es decir, la producción de proteínas terapéuticas recombinantes usando plantas como biofábricas, está bien ilustrado por un número de productos terapéuticos que están actualmente sometidos a evaluaciones clínicas (Paul y Ma, 2011). Las ventajas potenciales de utilizar sistemas de expresión basados en plantas incluye la posibilidad de producir proteínas complejas que requieren modificaciones postraduccionales (ausentes en sistemas procariotas), la exclusión de la posibilidad de introducir agentes patógenos humanos durante el proceso de manufactura (comúnmente visto en cultivos de células de mamífero) y la habilidad de escalar la producción de una manera eficiente y costeable (Fischer y Emans 2000; Fischer et al 2004; Karg y Kallio, 2009; Lienard et al, 2007; Ma et al, 2005; Mett et al, 2008).

Por otro lado, en la mayoría de los estudios realizados sobre la producción de la proteína HN, el fin era el evaluar una respuesta de inmunización (producción de anticuerpos IgG o IgA, anti-HN) después de la inoculación con la proteína HN producida (Berinstein et al. 2005; Guerrero-Andrade et al. 2006; Yang et al. 2007; Hahn et al. 2007; Cardineau et al 2008; Lee et al 2008; Zoth et al 2009; 2011). Sin embargo, en solo algunos trabajos se evaluó la actividad biológica de la proteína, ya sea su actividad hemaglutinante (aglutinación de eritrocitos) o de neuraminidasa (sialidasa). Esto cobra relevancia en el sentido de que, más allá de la capacidad de despertar una respuesta inmunológica humoral (a través de la producción de anticuerpos anti-HN) es importante evaluar si la propia proteína HN tiene la capacidad de modular una respuesta de tipo celular, a través de su actividad biológica

hemaglutinante y/o de neuraminidasa. Tomando importancia sobre todo en su uso no como una vacuna para prevenir la enfermedad en aves de corral, sino como un agente anti-tumoral/inmunoestimulador en células de humano, como ya se ha demostrado en estudios previos que la sola presencia de la glicoproteína HN, es capaz de estimular actividad inmune a través de la activación de células Natural Killer (NK), macrófagos y células T sensibilizadas (Avki et al, 2004; Pecora et al, 2002; Umansky et al, 1996).

Tabla 1. Producción de vacunas de subunidad basadas en las proteínas de superficie del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV).

Abreviaturas: HN= Hemaglutinin-neuraminidasa, F= Fusión, ND= No determinado, CMV= virus del mosaico del pepino, PVX= virus X de la papa.

| Patógeno/hospedero | Antígeno | Sistema de producción | Respuesta inmune | Referencia |
|--------------------|-----------------------|--------------------------------|--|---------------------------------------|
| NDV/Aves | Glicoproteínas F y HN | Hojas de papa | Immunogénico en ratón por administración oral y parenteral | Berinstein et al. (2005) |
| | F y HN epítomos | Vectores de CMV en tabaco | ND | Zhao y Hammond (2005) |
| | F y HN epítomos | Vectores de PVX en tabaco | ND | Natilla et al. (2006) |
| | Glicoproteína F | Semillas de maíz | Inmunogénico y protector en pollos por administración oral | Guerrero-Andrade et al. (2006) |
| | | Semillas y hojas de arroz | Inmunogénico en ratón por administración parenteral | Yang et al. (2007) |
| | Glicoproteína HN | Hojas de tabaco | Inmunogénico en pollos por administración oral | Hahn et al. (2007) |
| | Glicoproteína HN | Hojas de tabaco | ND | Gomez et al 2009 |
| | Glicoproteína HN | Cultivo celular | Inmunogénico en pollos y conejos por administración oral y parenteral | Cardineau et al 2010 |
| | Glicoproteína HN | Microalgas | ND | Bayne et al 2011 |
| | Glicoproteína HN | Baculovirus/células de insecto | Inmunogénico en pollos por administración parenteral; inmunogénico en pollos por administración parenteral; inmunoreactivo con suero de pollos vacunados con NDV | Lee et al 2008; Zoth et al 2009; 2011 |
| Glicoproteína HN | <i>E. coli</i> | Inmunogénico combinandola | Lee et al 2010 | |

| | | | |
|---------------------------------|--|---|---------------------|
| | | con una vacuna NDV comercial, en pollos por administración parenteral | |
| Glicoproteína HN/ectodominio HN | <i>Centella asiática/Células de tabaco</i> | ND/Inmunogénico en ratón | Lai et al 2012/2013 |

1.3- Inmunobiología del Cáncer.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2014), para el 2014, el cáncer fue la principal causa de muerte alrededor del mundo, con cerca de 8.8 millones de muertes (13% de todas las muertes). Alrededor de 70% de las muertes por cáncer en 2008 ocurrieron en países en vías de desarrollo. Cada órgano del cuerpo humano puede ser afectado sin importar la edad, género, herencia étnica, alimentación o el ambiente. Los principales tipos de cáncer son el de pulmón, estómago, hígado, colorrectal y de las glándulas mamarias.

En general, el cáncer es el resultado ya sea por el decrecimiento en la muerte celular (apoptosis) o por un incremento en la replicación celular (Reed, 1999). En otras palabras, cualquier desregulación en el ciclo celular o en la programación de la apoptosis, resulta en un crecimiento celular descontrolado (Lowe y Lin, 2000). Los mecanismos fundamentales de la división celular y la replicación del ADN llevan el peligro inherente de que la maquinaria de replicación inevitablemente cometa errores, lo que podría comprometer la integridad del genoma y potencialmente resultar en la formación de cáncer. Una amplia investigación en el último medio siglo ha revelado que el cáncer es una enfermedad genética que se produce por un proceso evolutivo donde las células somáticas adquieren mutaciones múltiples que sobrepasan a las barreras que normalmente frenan su expansión incontrolada. La devastación causada por las células cancerosas puede ser letal, pero, afortunadamente, existen numerosos mecanismos intrínsecos y extrínsecos supresores de tumores para evitar su desarrollo (Vesely et al 2011).

Una variedad de mecanismos intrínsecos supresores de tumores intentan reparar las mutaciones genéticas y desencadenarán la senescencia o apoptosis que deben reparar la falla y la proliferación celular aberrante. La senescencia celular, un estado caracterizado por la retención permanente del ciclo celular con cambios específicos en la morfología y la expresión de genes que lo distinguen de la quiescencia (retención del ciclo celular reversible), es inducida por numerosas proteínas celulares (por ejemplo, p53) que detectan alteraciones genómicas causadas

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

por daños mutagénicos (Xue et al 2007). Además, la senescencia celular se desencadena por oncogenes activados, y en la actualidad es cada vez más evidente que el escape de la senescencia inducida por oncogenes es un requisito previo para la transformación celular. De tal forma que las células cancerosas deben adquirir lesiones cooperantes (sobrexpresión de c-Myc, ciclinas tipo D y, pérdida de *p53* y *p16*) que desacoplen la señalización mitogénica Ras de la senescencia a la proliferación indefinida (Serrano et al 1997).

Otros mecanismos supresores de tumores intrínsecos, incluyendo *p53*, censuran la actividad de oncogenes y encienden la maquinaria de muerte celular programada. Además, la respuesta al estrés celular, lesiones, la falta de señales de supervivencia o las alteraciones en la integridad de las mitocondrias resultan en la liberación de efectores proapoptóticos que desencadenan la muerte celular mediante la activación terminal de caspasas efectoras (caspasa 3/7) (Danial et al 2004).

En contraste, una segunda vía de muerte celular se activa a través de la unión de los receptores de muerte de la superficie celular, tales como el receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), receptor 2 del ligando inductor de apoptosis relacionada con el TNF (TRAIL-R2, DR5), y Fas / CD95 (Peter y Krammer 2003), con los correspondientes ligandos de la superfamilia TNF que inducen la formación de un complejo de señalización que activa la caspasa apical 8 para iniciar la apoptosis. Por otra parte, se está poniendo cada vez más atención en las vías de muerte celular alternativas como la necrosis, la autofagia, y la catástrofe mitótica que pueden detener el proceso de transformación (Danial et al 2004).

En este sentido, el sistema inmune tiene tres funciones primarias en la prevención de tumores. En primer lugar, puede proteger al huésped de tumores inducidos por virus mediante la eliminación o la supresión de infecciones virales. En segundo lugar, la eliminación oportuna de los agentes patógenos y la pronta resolución de la inflamación puede impedir el establecimiento de un entorno inflamatorio propicio para la tumorigénesis. Finalmente, el sistema inmune puede identificar específicamente y eliminar las células tumorales en ciertos tejidos en base a la expresión de antígenos específicos tumorales (TSA). Este tercer proceso, conocido como inmunovigilancia del cáncer, se produce cuando el sistema inmunológico identifica células transformadas que han escapado a mecanismos celulares intrínsecos supresores de tumores y los elimina antes de que pueda establecer malignidad. Estas células inmunes efectoras emplean diversos mecanismos para controlar los objetivos tumorales, incluyendo la inducción de muerte celular tumoral por las vías de los receptores mitocondriales y de muerte celular. Por lo tanto la evasión de la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

inmunovigilancia se refiere a menudo como la séptima característica del cáncer (Dunn et al 2002; Zitvogel et al 2006).

Adicionalmente, diferentes investigaciones han mostrado evidencia de que el sistema inmunológico no sólo protege al huésped frente a la formación de tumores, sino también edita la inmunogenicidad del tumor. Estos nuevos datos indujeron un refinamiento del concepto inmunovigilancia del cáncer y condujeron a la formulación de la hipótesis de inmunoedición del cáncer, que hace hincapié en las acciones duales de la inmunidad en la protección del hospedero y el modelado de tumores en el desarrollo tumoral. Actualmente, se ve a la inmunoedición del cáncer como un proceso dinámico compuesto por tres fases distintas: la eliminación, el equilibrio y el escape (Dunn et al 2002; 2004; 2004a; 2006; Smyth et al 2006; Swann y Smyth 2007) (Figura 3).

La eliminación, es una vista modernizada de la inmunovigilancia del cáncer en el que las moléculas y células tanto de la inmunidad innata como adaptativa, trabajan juntas para detectar la presencia de un tumor en desarrollo y lo destruyen mucho antes de ser clínicamente evidente. En casos en los que la destrucción de las células tumorales llega a su culminación, la fase de eliminación representa un punto final de la inmunoedición del cáncer. Sin embargo, las variantes de células tumorales a veces pueden no ser completamente eliminadas, sino más bien entran en una fase de equilibrio en la que el sistema inmunológico controla la expansión de células tumorales. En esta fase de equilibrio, las células tumorales pueden ser funcionalmente inactivas y permanecer clínicamente inaparentes para la vida del huésped. Por lo tanto, el equilibrio, es un potencial segundo punto final estable de la inmunoedición del cáncer. Finalmente, ya sea como resultado de cambios que se producen (a) en la población de células tumorales debido a un proceso de inmunoedición activo o (b) en el sistema inmune del huésped, como resultado de incrementos en la inmunosupresión inducida por el cáncer o avería del sistema inmune debido al proceso natural de envejecimiento, la latencia funcional de la población de células tumorales se puede romper, lo que lleva a la progresión de estas células en la fase de escape, donde comienzan a crecer de una manera inmunológicamente sin restricciones y emerger como la enfermedad clínicamente evidente (Vesely et al 2011).

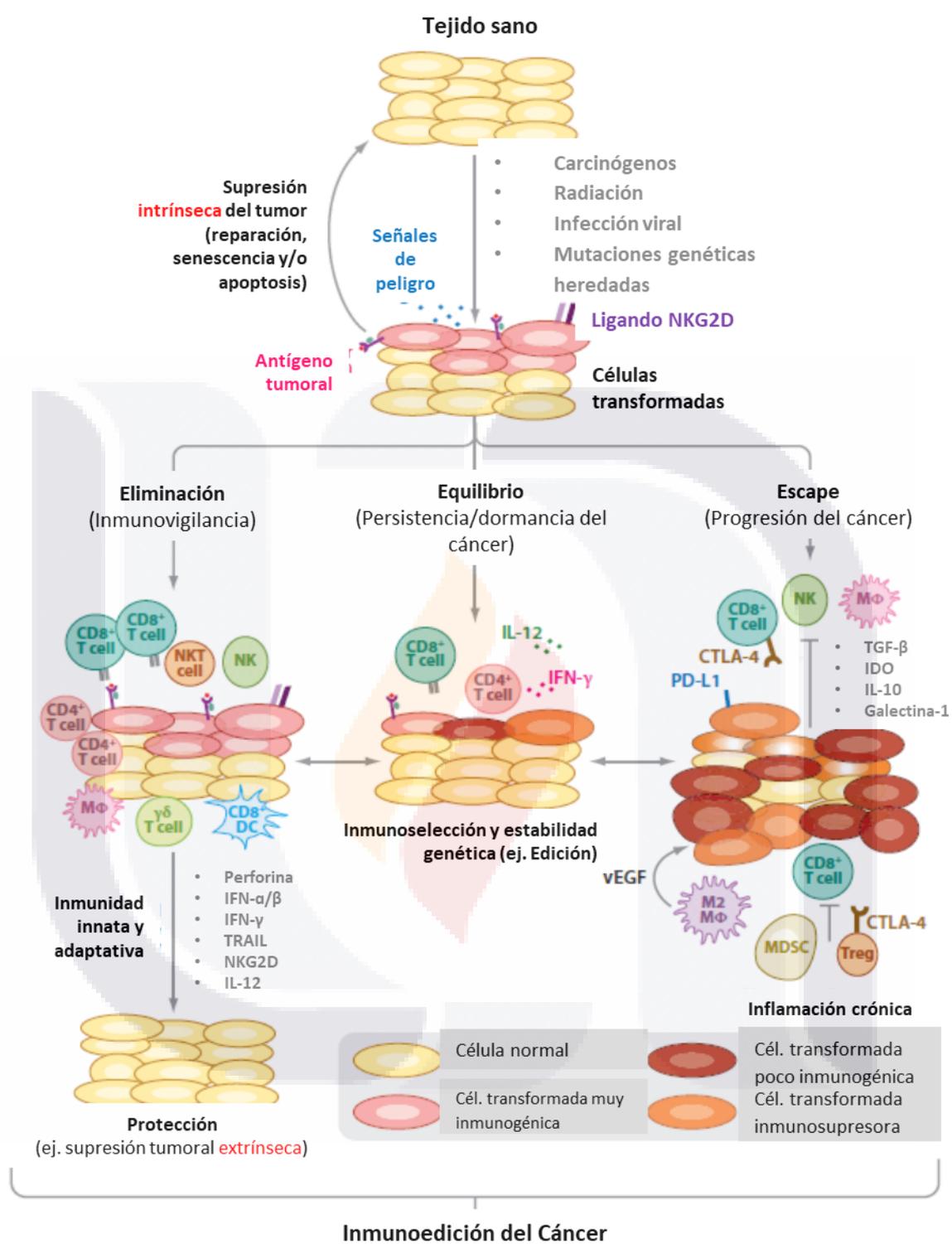


Figura 3. Las tres fases de la inmunoección del cáncer.

La inmunoección del cáncer es el resultado de tres procesos que funcionan de forma independiente o en secuencia para controlar y dar forma al cáncer. Una vez que las células normales se transforman en células tumorales mediante la combinación de oncogenes adquiridos, y que fracasaron los mecanismos intrínsecos supresores de tumores, el sistema inmune puede funcionar como un supresor tumoral extrínseco mediante la eliminación de las células tumorales o la prevención de su extensión. En la primera fase, la eliminación, conocida

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

previamente como inmunovigilancia del cáncer, las células inmunitarias innatas y adaptativas, así como las algunas moléculas reconocen a las células transformadas y las destruyen, dando lugar a un retorno fisiológico al tejido normal. Sin embargo, si la inmunidad antitumoral es incapaz de eliminar completamente las células transformadas, las variantes tumorales supervivientes pueden entrar en la fase de equilibrio, donde las células y las moléculas de la inmunidad adaptativa impiden la extensión del tumor. Estas variantes pueden eventualmente adquirir mutaciones adicionales que resultan en la evasión del reconocimiento de células tumorales, la muerte, o el control por las células inmunes y el progreso a tumores malignos clínicamente detectables en la fase de escape. (Abreviaturas: CTLA-4, los linfocitos T citotóxicos asociados a proteína-4; IDO, indolamino 2,3-desoxigenasa; IFN, interferón, IL, interleucina; Mφ, macrófagos; MDSC, células supresoras de origen mieloide; NK, natural killer; NKG2D, NK grupo 2, miembro D; PD-L1, ligando 1 de la muerte celular programada; TGF-β, factor de crecimiento transformante-β; TRAIL, ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral; Treg, células T reguladoras; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular.) Figura modificada de Nature Immunology (Dunn et al 2002) por Vesely et al (2011).

1.4- Interacciones del Cáncer con el Sistema Inmune Innato.

A pesar del progreso general obtenido en la supervivencia de pacientes con cáncer (diagnóstico y tratamiento), los presentes regímenes terapéuticos no han mejorado la supervivencia de pacientes con metástasis. La limitada eficacia de los quimioterapéuticos, que pueden también tener efectos secundarios indeseables y además de los altos costos de implementación, hace su uso virtualmente inaccesible en países con economías en desarrollo, los cuales irónicamente tienen la mayor incidencia de cáncer. Debido a esto, el objetivo de la terapia para el cáncer radica en promover la muerte celular de células dañadas, pero sin causar daños significativos a las células normales y, a un costo accesible (Gerl y Vaux, 2005).

Como ya se mencionó, el sistema inmune juega un papel muy importante en el control de las células tumorales. Por ello, el objetivo final de la inmunoterapia activa contra el cáncer es lograr la inmunidad antitumoral que se ha demostrado en los ejemplos esporádicos de la regresión/contención espontánea del tumor, así como el reciente éxito de la inmunoterapia pasiva tales como la terapia adoptiva de células T y la terapia con anticuerpos (Morgan et al 2006; Robbins et al 2011; Yang et al 2003; Baselga et al 2012; Kawai y Akira 2010). Recientes avances han definido varias interacciones ligando/receptor y vías moleculares que tienen un efecto posterior significativo sobre la respuesta inmune adaptativa en diversas circunstancias. Por ejemplo, ahora se sabe que el sistema inmune innato de humanos, a través de sus receptores de reconocimiento de patrón (PRRs) de la superficie celular, reconoce patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) conservados entre microbios o patrones moleculares asociados a daños (DAMPs), liberados de las lesiones de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

tejidos, para iniciar la respuesta inmune innata durante la infección y la inflamación de los tejidos, respectivamente (Chen y Nunez 2010).

Las principales células efectoras del sistema inmune que se dirigen directamente a las células del cáncer incluyen células asesinas naturales (NK), células dendríticas (DCs), macrófagos, leucocitos polimorfonucleares (PMN incluyendo neutrófilos, eosinófilos y basófilos), mastocitos y linfocitos T citotóxicos. Células NK, DCs, PMN, mastocitos y macrófagos son efectores de primera línea sobre las células dañadas y las células cancerosas. Las células NKT y células $T\gamma\delta$ juegan papeles como componentes de la inmunidad innata, a través de una estrecha interacción con las células del sistema inmune adaptativo, tales como linfocitos CD4+ y T CD8+ con efectos citotóxicos y de memoria (Liu y Zeng, 2012; Norwaski et al 2013). Así, la importancia del sistema inmune innato en la limitación de la progresión del cáncer se ha puesto de manifiesto recientemente con las siguientes interacciones moleculares directas entre el cáncer y las células efectoras inmunes innatas.

Células NK. Las células NK constituyen la célula del sistema inmune innato primario responsable de la muerte de las células cancerosas que no expresan el complejo principal de histocompatibilidad (MHC), mediante la liberación de pequeñas proteínas citotóxicas tales como la perforina y la granzima, que causan apoptosis en las células diana. Hay 2 tipos funcionales de receptores en la superficie de células NK: receptores estimulantes y receptores inhibitorios. Ambos tipos de receptores pueden pertenecer a dos familias principales: receptores de células killer tipo inmunoglobulina (KIR) y los receptores similares a la lectina.

La molécula NK del grupo 2D (NKG2D) es quizás el más conocido de los receptores estimulantes y es una molécula homodimérica tipo lectina (Liu y Zen 2012; Norwaski et al 2013). Los ligandos en las células tumorales para NKG2D incluyen moléculas inducidas tras el estrés celular, como son proteínas relacionadas a MHC de clase I (MICA y MICB), y la proteína de unión UL16 en humanos (Figura 4). La unión de los ligandos relacionados con el estrés, anteriormente mencionados, con NKG2D estimula a las células NK, lo que lleva a la secreción de interferón- γ (IFN- γ) y perforina, la liberación de citocinas inflamatorias, y la inducción de apoptosis en las células cancerosas. Otros receptores NK estimulantes también han sido caracterizados, tales como NKp30, NKp44, y NKp46 en seres humanos, y la molécula accesoria DNAX en humanos y ratones. Los receptores inhibidores de células NK constan de los receptores tipo KIR y los receptores similares a la lectina NKG2A/CD94 compartidos por seres humanos y ratones. La molécula no clásica del MHC de clase I, HLA-G, en tumores también funciona como un ligando para los KIR que pueden inhibir la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

citotoxicidad mediada por células NK. La molécula no clásica del MHC de clase I HLA-E, es el ligando para el receptor heterodimérico NKG2A/CD94 (Liu y Zeng, 2012; Norwaski et al 2013).

Por otro lado, los ligandos de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) se expresan ampliamente en la superficie de células NK (Figura 4): TNF, ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF (TRAIL), linfotóxina, ligando Fas, ligando del 4-1BB, proteína inducible tipo linfotóxina que compite con la glicoproteína D para la unión del mediador de entrada del virus del herpes (HVEM) en células T (LIGHT), ligando OX40 (OX40L), CD40 (CD40L), CD30 (CD30L) y CD27 (CD27L). En paralelo, la familia de receptores TNF, como TNFR, receptor de TRAIL, el receptor de la linfotóxina, Fas, 4-1BB, los receptores de HVEM/LTB, OX40, CD40, CD30, y CD27 se expresan en muchas líneas celulares tumorales. La unión complementaria entre ligandos de TNF y TNFR puede inducir eficazmente la muerte apoptótica de las células tumorales. Por lo tanto, la expresión inducida o mediante ingeniería de los receptores de la familia de TNF en las células cancerosas representa una vía amplia para la inmunoterapia activa. Además, los tumores recubiertos con anticuerpos contra moléculas de la superficie celular pueden ser directamente reconocidos por varias células innatas a través de receptores para la fracción cristalizante o Fc (FcR), conocidos como receptores de inmunoglobulinas. El FcR para IgG (FcγR), de forma general, incluye 2 tipos funcionales de receptores, de activación o de inhibición. Células tumorales recubiertas de anticuerpos pueden ser eliminadas por células NK o macrófagos con la activación de FcγRIII, denominada citotoxicidad celular mediada por anticuerpos. Las células NK expresan únicamente la activación de FcγRIII o CD16 para IgG, sin que se hayan detectado receptores FcγR inhibidores hasta el momento (Liu y Zeng, 2012; Norwaski et al 2013).

Macrófagos. Las células tumorales apoptóticas se pueden eliminar de manera eficiente por los macrófagos para evadir la autoinmunidad. Estas células tumorales expresan las moléculas llamadas "cómeme" en la superficie celular (Figura 4) para el reconocimiento y la fagocitosis por macrófagos. Estas señales incluyen lípidos como la fosfatidilserina (PS), PS oxidada, lipoproteína de baja densidad oxidada, y la proteína multifuncional calreticulina (CRT). Estas moléculas son translocadas o redistribuidas para exponerse en la superficie de las células tumorales durante la apoptosis. CRT también se asocia con el receptor CD91 en macrófagos y participa en la asimilación de células apoptóticas mediante la interacción con la proteína soluble del complemento C1q y su ligando PS. Receptores Scavenger, tales como SR-A, CLA-1, CD36, CD68, LOX-1, y estabilina-2, pueden unirse a PS oxidada y motivos oxidados de lipoproteínas

de baja densidad en las células tumorales apoptóticas. Las proteínas de células T tipo inmunoglobulina de mucina (TIM) (TIM-1, TIM-3, y TIM-4), se identificaron recientemente como receptores críticos para PS como mediador en la captación de células apoptóticas. CD36 también puede formar complejos con los receptores de la integrina $\alpha_v\beta_3$ en los macrófagos, mientras que el CD14 en macrófagos puede servir como receptor para la molécula de adhesión intercelular-3, y desencadenar la fagocitosis y el aclaramiento de células apoptóticas. En circunstancias normales en el ambiente del tumor, la interacción entre las células tumorales apoptóticas y macrófagos fagocíticos, conduce a la tolerancia inmune sin provocar citocinas proinflamatorias significantes. A diferencia de las células NK, los macrófagos expresan tanto Fc γ R de activación como de inhibición, simultáneamente. Fc γ RI (CD64) y Fc γ RII (CD32) de activación estimulan la citotoxicidad hacia las células tumorales. En contraste, Fc γ RIIb es el único receptor inhibitorio sobre los macrófagos en ratones, que es responsable de los efectos inhibitorios sobre los macrófagos, incluyendo la inhibición de la fagocitosis, disminución de la liberación de citocinas, producción de superóxido, y el bloqueo de la vía de señalización de receptores tipo Toll 4 (TLR4). En el ambiente tumoral, los macrófagos se cree son los principales contribuyentes a la inflamación crónica que hace un ambiente inmunosupresor, beneficiando el crecimiento del tumor (Liu y Zeng, 2012; Norwaski et al 2013).

DCs. Las DCs son quizás las células presentadoras de antígeno más profesionales, y son el puente entre el sistema inmune innato y adaptativo. Los 2 grupos principales de DCs se conocen como DC mieloides y DC plasmocitoides. Subtipos funcionales de DCs mieloides en la piel, las células de Langerhans epidérmicas y las DCs dérmicas intersticiales también se caracterizan con distintos potenciales de inducción inmune. Las células de Langerhans activadas secretan interleucina 15 (IL-15) e inducen la activación de células T CD4+ y CD8+ para inducir la inmunidad celular. Las DCs dérmicas intersticiales estimulan indirectamente la activación de células B para producir la inmunidad humoral. Acoplando a las DCs con diferentes receptores y subpoblaciones, estas estimulan diferentes respuestas de inflamación, produciendo múltiples resultados de células T, incluyendo las células T auxiliares o cooperadoras de tipo 1 (Th1), Th2, Th17, Th21, y células T reguladoras (Liu y Zeng, 2012; Norwaski et al 2013).

Con respecto a las interacciones directas con las células cancerosas, las DCs fagocitan células cancerosas apoptóticas utilizando integrina $\alpha_v\beta_5$ y receptores CD36. Al igual que en los macrófagos, las DCs pueden reconocer las llamadas señales "cómeme" en las células apoptóticas a través de receptores endocíticos, receptores

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Scavenger y receptores TIM. Además, el marcador de células apoptóticas, fosfatidilserina (PS), puede ser capturado por el receptor TAM (designado así por las primeras letras de sus componentes miembros de la familia de receptores tirosinquinasa; **T**yro3, **A**xl y **M**er) en DCs y macrófagos utilizando acoplamiento molecular con Gas6/proteína S, y por medio de la integrina $\alpha_v\beta_3$ usando un acoplamiento con MFG-E8. Los receptores TAM promueven la fagocitosis de las células tumorales apoptóticas e inhiben la inflamación en DCs y macrófagos. El complejo de integrina $\alpha_v\beta_3$ es capaz de mediar la asimilación de las células cancerosas apoptóticas. Similar a los macrófagos, la fagocitosis de las células tumorales apoptóticas por DCs, en ausencia de señales de peligro, generalmente conduce a la tolerancia inmune (Liu y Zeng, 2012; Norwaski et al 2013).

Las DCs también expresan tanto Fc γ R de activación como de inhibición. En comparación con otras maneras de captación de antígenos, las células tumorales recubiertas de anticuerpos se internalizan de manera más eficiente en DCs a través de la activación de Fc γ RI (CD64) and Fc γ RIII (CD16), lo que lleva a una más eficiente presentación de antígeno restringida a MHC I y II, y a la inducción de células efectoras y de memoria T específicas de tumor. Por lo tanto, la inflamación y la respuesta inmune adaptativa podrían ser disparadas por células cancerosas y DCs, encontrándose a través de la activación de la vía de señalización Fc γ R, y este proceso se modula negativamente por la coexpresión del inhibidor Fc γ RIIb y receptores TAM en DCs. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que la captación de antígenos no acompaña a la inducción de células T efectoras. La inducción de la inmunidad adaptativa activa requiere señales de peligro o maduración de DCs durante el procesamiento de antígenos (Liu y Zeng, 2012; Norwaski et al 2013).

Células polimorfonucleares y mastocitos. Las células polimorfonucleares (PMN; neutrófilos y eosinófilos) y mastocitos asociados al tumor pueden tener un rol significativo en la carcinogénesis y en la metástasis. Sin embargo, pocos estudios se han enfocado en el reconocimiento molecular directo entre las células tumorales y estas células del sistema inmune innato. Lo que se sabe es la activación e inhibición de Fc γ R en PMN y mastocitos, para interactuar con antígenos cubiertos por anticuerpos sobre células tumorales. La activación de Fc γ R induce en neutrófilos la liberación de citocinas y quimioatrayentes, los cuales influyen el reclutamiento y la activación de DC y macrófagos en el ambiente tumoral (Liu y Zeng, 2012; Norwaski et al 2013). La activación de Fc γ RIIB en neutrófilos, decrece la producción de especies reactivas de oxígeno, las cuales son citotóxicas para los tumores. Mientras que en los mastocitos, la estimulación de Fc γ RIIB puede reducir la liberación mediada por IgE de

moléculas almacenadas en los gránulos, IL-4, e histamina, las cuales disparan la respuesta inflamatoria en el ambiente tumoral (Liu y Zeng, 2012; Norwaski et al 2013).

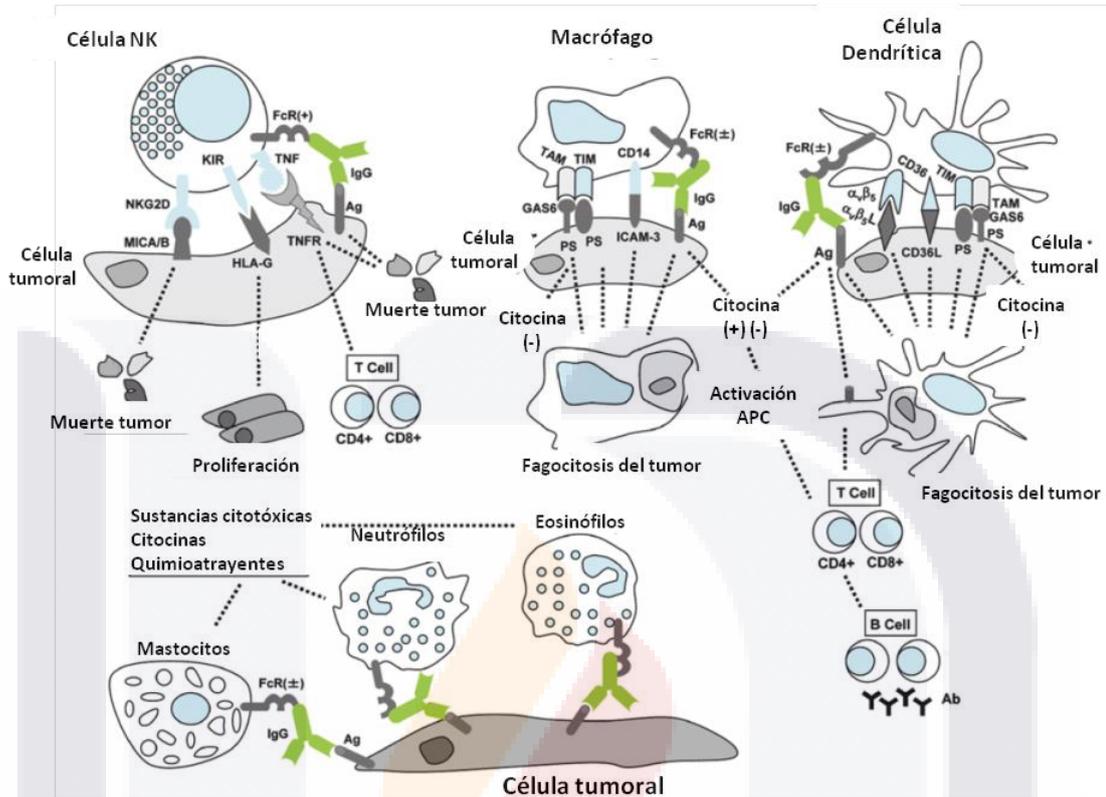


Figura 4. El reconocimiento directo del cáncer por el sistema inmune innato.

Las células natural killer (NK), macrófagos, células dendríticas (DCs), neutrófilos, eosinófilos y mastocitos son los componentes celulares del sistema inmune innato. NKG2D, un receptor estimulador de las células NK, reconoce específicamente al complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase-I- relacionado a la cadena de la proteína A / B (MICA / B) en los cánceres para estimular la muerte celular. Receptores inhibidores tales como los receptores tipo inmunoglobulina de células K (KIR) detectan a la molécula no clásica del MHC de clase I, HLA-G, en los cánceres para prevenir la citotoxicidad de las células NK. La unión de la familia de ligandos del factor de necrosis tumoral (TNF), en las células NK, a receptores de la familia de TNF, en las células tumorales, desencadena la apoptosis en células malignas, lo que da lugar a la aparición de células T CD4 + y CD8 +. La función de las células NK también está mediada por la activación de receptores Fc (FcRs), como el FcγRIII o CD16 a través de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos. Los macrófagos fagocitan las células cancerosas apoptóticas utilizando CD14, la inmunoglobulina mucina de células T (TIM), TAM, y receptores FcR a través de la interacción con moléculas de adhesión intercelular-3 (ICAM-3), fosfatidilserina (PS), PS/Gas6, y complejo inmune, respectivamente. GAS6 funciona como el "puente" entre los receptores de PS y TAM. Existen ambos receptores Fc en macrófagos, activadores e inhibitorios (FcR-, inhibidor FcR+, activador) y están asociados con la producción de citocinas y superóxido; Las DCs pueden absorber células tumorales apoptóticas a través de receptores αβ5, CD36, FcR, TIM, y TAM. La secreción de citocinas de DCs y macrófagos promueve la activación de células presentadoras de antígeno (APC), lo que lleva a la respuesta inmune adaptativa celular y humoral. La activación de en células DCs ayuda a la presentación celular de antígenos tumorales. Receptores FcRs de activación e

inhibición se expresan también en los neutrófilos, eosinófilos y mastocitos, que reconocen directamente tumores recubiertos con anticuerpos para promover o inhibir la secreción de citocinas y quimiocinas de células inmunes innatas. Modificado de Liu y Zeng (2012).

1.5- Viroterapia

La resistencia del cáncer a las terapias convencionales (ej. quimioterapia) requiere la búsqueda de nuevas estrategias de tratamiento. Con ello, la idea de utilizar virus competentes con replicación para destruir cánceres es atractivo para este fin, pero no es nuevo. Ya a mediados de la década de 1950, se reportó que el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) tenía actividad oncolítica (Schirmmacher y Fournier 2009; Fournier y Schirmmacher 2013). La evaluación clínica de este virus durante varias décadas, como reactivo contra el cáncer en diversos entornos clínicos, corroboró su seguridad y efectividad. Esto se basa en la replicación selectiva y las actividades oncolíticas sobre el tumor, permitiendo que el virus infecte selectivamente las células tumorales, dejando a las células sanas intactas (Schirmmacher y Fournier 2009; Fournier y Schirmmacher 2013). Otro aspecto que ha recibido cada vez más interés es la propiedad de NDV para activar la inmunidad anti-tumoral del hospedero (Schirmmacher y Fournier 2009; Fournier y Schirmmacher 2013). Esto es crucial, ya que las respuestas inmunes antitumorales espontáneas a menudo no son lo suficientemente eficientes, debido a la incapacidad del tumor para apoyar una respuesta inmune o incluso para inhibirla a través de varios mecanismos activos y pasivos (evasión del tumor y la inmunosupresión inducida por el tumor) (Schirmmacher y Fournier 2009; Lam et al, 2011; Zamarin et al, 2012; Fournier y Schirmmacher 2013).

Entre todos los virus oncolíticos que han sido investigados como reactivos contra el cáncer, el NDV ha surgido como un agente particularmente prometedor para la viroterapia de cáncer. Este interés puede explicarse por tres características que presenta este virus: (i) replicación selectiva en células tumorales y perfil seguro, (ii) el potencial oncolítico y (iii) las propiedades inmunoestimulantes (Schirmmacher y Fournier 2009; Lam et al, 2011; Zamarin et al, 2012; Fournier y Schirmmacher 2013).

Dentro de las tres características mencionadas anteriormente, es la inmunoestimulante la que cobra gran importancia para el presente estudio. Una de las características importante, está asociada a su capacidad para inducir grandes cantidades de IFN de tipo I (IFN- α) cuando está en contacto con las células de sangre periférica humana. Esto está relacionado con la naturaleza de las estructuras de ARN de doble cadena (dsARN), que se producen en el citoplasma durante la replicación viral, provocando de esta manera una fuerte respuesta de IFN celular (Schirmmacher y

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Fournier 2009; Fournier y Schirmmacher 2013). Por otro lado, también se ha demostrado que la proteína HN de superficie viral, es un elemento importante para las propiedades inmunomoduladoras de este virus. Una infección por NDV de células tumorales modifica la superficie de las mismas, aumentando la expresión de las proteínas HN y F virales después de 10 horas. A través de su actividad de unión al receptor, las proteínas HN introducen nueva fuerza de adherencia de células para las interacciones de linfocitos y células co-estimuladoras (Schirmmacher y Fournier 2009; Fournier y Schirmmacher 2013). Además, la infección de células tumorales humanas por NDV conduce a la sobre regulación de HLA y moléculas ICAM-1 (Schirmmacher y Fournier 2009; Fournier y Schirmmacher 2013). Otros eventos son la inducción de la quimiocina RANTES y la proteína 10 inducida por IFN γ (IP10) y finalmente la apoptosis. El dsARN, un subproducto de la replicación viral, puede activar receptores citoplasmáticos como PKR y RIG-I, así como endosomales, TLR3 (Schirmmacher y Fournier 2009; Lam et al, 2011; Zamarin et al, 2012; Fournier y Schirmmacher 2013).

Todas las señales de peligro, que derivan de la infección por NDV (dsARN, proteína HN e IFN- α), permiten la activación de múltiples respuestas inmunitarias innatas (monocitos, DCs y las células NK). También juegan un papel importante durante la presentación de antígenos asociados a tumores (TAA) para las células T (Schirmmacher y Fournier 2009; Fournier y Schirmmacher 2013). Tales co-señales son importantes para la inducción de una respuesta inmune adaptativa efectiva contra el tumor, incluyendo células T CD8⁺ y CD4⁺. Como un fuerte inductor de IFNs de tipo 1, se espera que el NDV tenga un fuerte efecto en la respuesta inmune, dado el papel recientemente descrito de IFNs de tipo 1 en la inmunovigilancia de anti-glioma en estudios en ratón (Schirmmacher y Fournier 2009; Fournier y Schirmmacher 2013). El contexto pro-inflamatorio, que es inducido después de la adición del virus, puede ser capaz de romper la tolerancia hacia el tumor, como se ha demostrado en clones de células T *in vitro* (Schirmmacher y Fournier 2009; Fournier y Schirmmacher 2013). En contraste, otros virus, que se han adaptado al sistema inmune de los mamíferos, han desarrollado inhibidores de la inmunidad codificados por el virus, tales como inhibidores TAP, señuelos de citocinas, micro-ARN y proteínas virales que antagonizan la inducción de IFN de tipo I (Schirmmacher y Fournier 2009; Lam et al, 2011; Zamarin et al, 2012; Fournier y Schirmmacher 2013).

1.6- Mecanismos de oncolisis mediada por NDV

Mecanismos directos. Los mecanismos subyacentes a la citotoxicidad mediada por NDV se han investigado en múltiples estudios. Uno de los mecanismos

directos es mediante la proteína F, la cual es responsable de la fusión viral con la membrana celular y de la propagación célula-célula del virus lo cual genera la formación de sincitia multinucleada y eventualmente la muerte celular. Por otro lado, en embriones de pollo inoculados con NDV revelaron evidencia de apoptosis en tejidos embrionarios (Lam et al, 2011; Zamarin et al, 2012). Múltiples estudios posteriores confirmaron el papel dominante de la apoptosis en la muerte celular inducida por NDV. La inducción de la apoptosis por NDV requiere la entrada del virus, la replicación, síntesis *de novo* de proteínas y activación de caspasas (Lam et al, 2011; Zamarin et al, 2012; Fournier y Schirmmacher 2013). La descripción de las vías apoptóticas activadas en las células infectadas por el NDV reveló tendencias comunes, aunque se observaron diferencias dependiendo del sistema utilizado. La caracterización de las cepas NDV Beaudette C y La Sota en líneas celulares de cáncer de origen ectodérmico, endodérmico y mesodérmico, reveló que NDV puede inducir apoptosis por la activación de ambas vías apoptóticas, extrínseca e intrínseca (Fournier y Schirmmacher 2013). La infección por NDV de las células tumorales condujo a la producción de TNF- α y TRAIL soluble en las células tumorales y de manera específica para el virus, lo que resultó en la activación de la caspasa-8, aunque en varias líneas celulares la apoptosis se indujo sin activación de caspasa-8 (Lam et al, 2011; Zamarin et al, 2012). En todas las líneas de células tumorales, la infección por NDV condujo a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la activación de caspasa-9, destacando la importancia de la vía intrínseca en la activación de la apoptosis mediada por NDV (Lam et al, 2011; Zamarin et al, 2012) (Schirmmacher y Fournier 2009; Lam et al, 2011; Zamarin et al, 2012; Fournier y Schirmmacher 2013).

La inducción de apoptosis mediada por NDV es independiente de la señalización de IFN, ya que la apoptosis también se indujo en líneas celulares tumorales defectuosas en la producción de IFN- α o defectuoso en las respuestas al IFN- α (Schirmmacher y Fournier 2009; Fournier y Schirmmacher 2013). La activación de la apoptosis probablemente procede a través de la ruta mitocondrial y la activación de la caspasa-9, con la activación posterior de la caspasa-8. En conjunto a estos hallazgos, el uso de varias líneas celulares de cáncer humano reveló que la cepa NDV MTH-68/H induce la muerte celular independientemente de la activación de caspasa-8 y caspasa-9, y del estado de la molécula p53 (Schirmmacher y Fournier 2009; Fournier y Schirmmacher 2013). También se ha demostrado que la replicación viral, en células de rata PC12, conducía a la activación del retículo endoplásmico (RE) eIF2a quinasa PERK con la fosforilación resultante de eIF2a y activación de la caspasa-12 (Schirmmacher y Fournier 2009; Fournier y Schirmmacher 2013). En contraste con estos

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

hallazgos, en las células Vero infectadas con NDV, la activación de la vía apoptótica extrínseca parece preceder a la de la vía intrínseca (Schirmmacher y Fournier 2009; Fournier y Schirmmacher 2013). De manera similar, se demostró que la ruta extrínseca estaba involucrada en las células de cáncer de pulmón A549 después de la infección con NDV, mientras que la fosforilación previamente mostrada de eIF2a o la activación de caspasa-12 en células PC12 no pudo confirmarse (Schirmmacher y Fournier 2009; Fournier y Schirmmacher 2013) (Schirmmacher y Fournier 2009; Lam et al, 2011; Zamarin et al, 2012; Fournier y Schirmmacher 2013).

Otras vías fueron adicionalmente implicadas en la apoptosis inducida por NDV. Estudios de la cepa MTH/68 en células PC12 revelaron que la inducción de apoptosis era independiente de la vía inducible por estrés quinasa N-terminal de c-Jun, de la vía p38 y de los mecanismos regulados por especies reactivas de oxígeno. En este estudio, la inhibición de p38 MAPK redujo la muerte celular de células A549 infectadas por NDV, aunque el mecanismo para esto todavía no está claro (Lam et al, 2011; Zamarin et al, 2012).

Es difícil conciliar las discrepancias entre estos múltiples estudios, aunque muchas de las diferencias podrían ser explicadas por las diferencias en las líneas celulares, las cepas virales y los ensayos de detección utilizados. En general, en base a múltiples estudios, la activación de la vía de apoptosis intrínseca parece jugar un papel clave en la muerte celular mediada por NDV. La activación diferencial de la vía intrínseca probablemente se produce en una manera línea celular- y virus-específica, y parece implicar la vía apoptótica extrínseca, vía estrés ER, vías de receptor tirosina quinasa y probablemente muchas otras vías que aún no se han caracterizado (Figura 5) (Lam et al, 2011; Zamarin et al, 2012).

Los factores específicos del virus también se han descrito para explicar los mecanismos que contribuyen a la apoptosis mediada por NDV. La transfección de un plásmido que codifica la glicoproteína HN en fibroblastos embrionarios de pollo, demostró inducir directamente apoptosis por un mecanismo aún no caracterizado (Lam et al, 2011; Zamarin et al, 2012). Recientemente, la caracterización de secuencias de proteínas de NDV revelaron regiones similares al dominio Bcl-2 pro-apoptótico homólogo-3 (BH3) en las proteínas M, L y F del NDV (Lam et al, 2011; Zamarin et al, 2012). Una transfección con las proteínas M y F en las células HeLa promovieron la muerte celular, mientras que la eliminación del dominio BH3 de la proteína M atenúa la inducción de la apoptosis por la proteína (Lam et al, 2011; Zamarin et al, 2012). Un análisis similar adicional de las proteínas NDV será importante, ya que pueden revelar mecanismos adicionales que subyacen a la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

especificidad de NDV para las células tumorales (Lam et al, 2011; Zamarin et al, 2012).

Mecanismo indirecto (inmuno-mediado). Además de sus efectos citopáticos directos, la actividad anticancerígena de NDV se asocia con la activación de una respuesta de la inmunidad innata y adaptativa. La infección de macrófagos de ratón con las cepas LaSota, Ulster y MTH-68/H ha demostrado que conduce a la regulación positiva de enzimas como ADA, iNOS, lisozima y fosfatasa ácida, así como la producción de óxido nítrico y TNF- α , dando como resultado el aumento de la actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo* (Lam et al, 2011; Zamarin et al, 2012). Además, monocitos estimulados con NDV Ulster mostraron mediar la muerte de células tumorales por inducción de TRAIL (Lam et al, 2011; Zamarin et al, 2012). La activación de las células NK también se ha implicado en la citotoxicidad mediada por NDV, ya que incubando PBMC de donantes sanos con NDV 73-T, mejoraron su citotoxicidad contra múltiples líneas celulares tumorales, siendo las células NK mediadoras predominantes de la lisis (Figura 5) (Schirmacher y Fournier 2009; Lam et al, 2011; Zamarin et al, 2012; Fournier y Schirmacher 2013).

También se ha revelado que la inducción de respuestas inmunes innatas en PBMC no depende de la replicación viral. De hecho, la transfección de una construcción que expresa la glicoproteína HN sola, fue suficiente para inducir la inducción de IFN- α y TRAIL (Schirmacher y Fournier 2009; Fournier y Schirmacher 2013) En base a estos hallazgos, una vacuna de ADN que expresaba formas citoplásmicas, secretadas y ancladas a la membrana de la glicoproteína HN, se evaluó para determinar el efecto antitumoral. La HN anclada a la membrana demostró tener actividad antitumoral superior tanto *in vitro* como *in vivo* (Schirmacher y Fournier 2009; Fournier y Schirmacher 2013). También está demostrado que la inmunización profiláctica con un plásmido que codifica la glicoproteína HN protege a los animales de la exposición posterior a células de carcinoma de mama DA3, un efecto que se demostró estaba asociado con un aumento en la infiltración de células NK y una disminución en las células supresoras derivadas de mieloides (Schirmacher y Fournier 2009; Fournier y Schirmacher 2013). Los mecanismos subyacentes a esos hallazgos no están claros, aunque la expresión de la HN en la superficie de las células presentadoras de antígeno aumenta las respuestas de linfocitos T citotóxicos contra un antígeno no relacionado, lo cual puede ser responsable de estas observaciones (Schirmacher y Fournier 2009; Fournier y Schirmacher 2013).

Efectos inmunoestimuladores directos en las células tumorales también se han observado. La infección de las células tumorales por NDV conduce a la expresión de

las glicoproteínas HN y F en la superficie, que ha demostrado cambiar la adhesividad de la superficie de las células tumorales para los eritrocitos y linfocitos, lo que lleva a la sobre regulación de marcadores de activación de células T en cultivos celulares mixtos de linfocitos-tumores (Schirmacher y Fournier 2009; Fournier y Schirmacher 2013) (Figura 5).

También se manifestó que la infección de células tumorales humanas con NDV Ulster induce la producción de IFN- β , RANTES e IP-10, y regula positivamente la expresión de MHC y las moléculas de adhesión celular ICAM-1 y LFA-3 (Lam et al, 2011; Zamarin et al, 2012) (Figura 5). Esto implica que la infección por NDV puede superar los efectos inhibidores del microambiente tumoral e inducir respuestas antitumorales inflamatorias favorables (Lam et al, 2011; Zamarin et al, 2012).

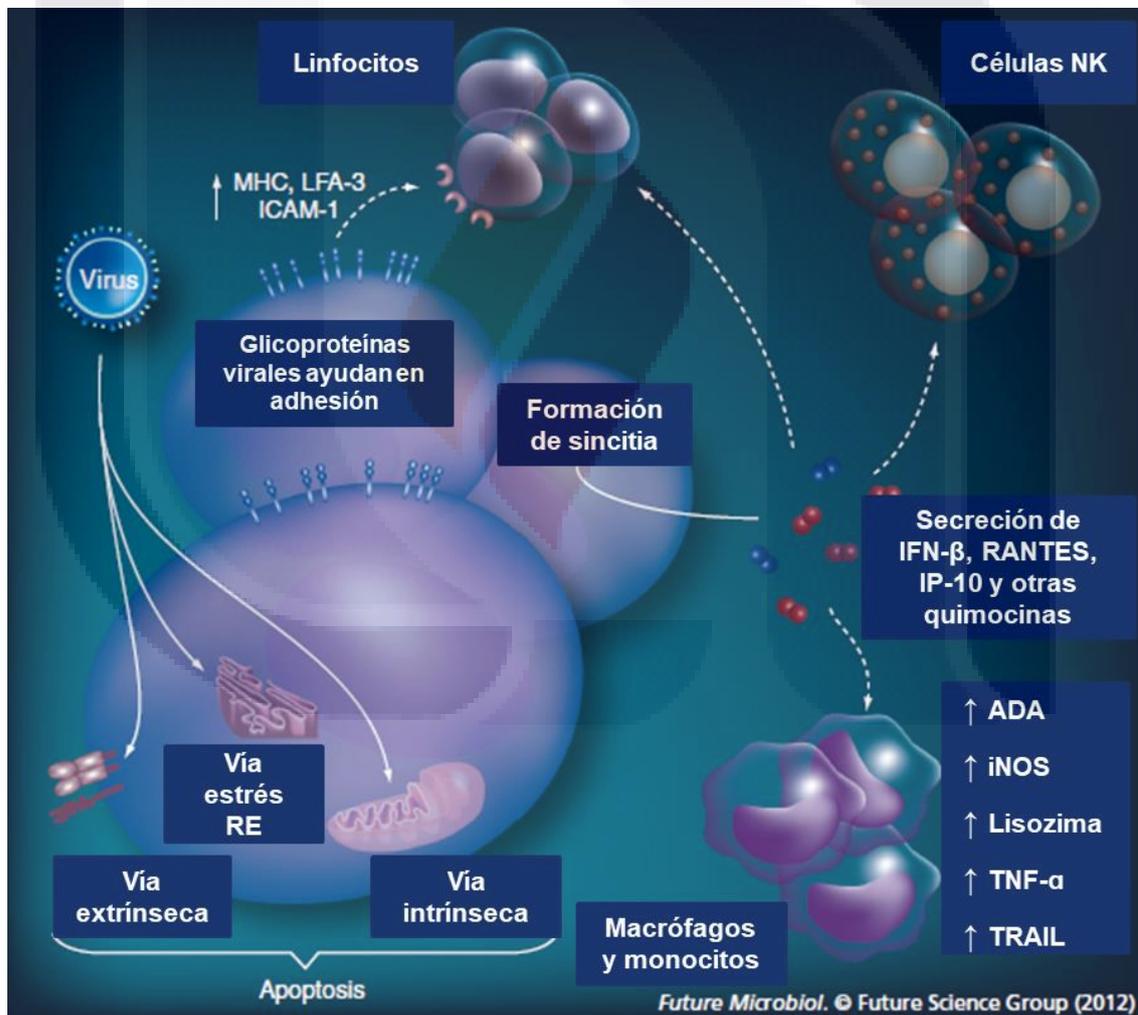


Figura 5. Mecanismos de los efectos antitumorales regulados por NDV.

La actividad citolítica de NDV en células cancerígenas es a través de mecanismos directos e indirectos. El mecanismo directo incluye la formación de sincitios multinucleados, activación de rutas apoptóticas extrínsecas e intrínsecas, activación de rutas de estrés RE y el involucramiento de vías MAPK. Los mecanismos indirectos incluyen la secreción de citocinas y

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

quimocinas proinflamatorias, las cuales reclutan mediadores de ambas respuestas inmunes, innata y adaptativa, como células NK, linfocitos y macrófagos. Las respuestas inmunes antitumorales son mayormente favorecidas si se potencia la adhesión de leucocitos a través de la unión a las glicoproteínas virales expresadas en la superficie de las células infectadas, mediante la regulación positiva de MHC y moléculas de adhesión celular, las cuales sirven para activar linfocitos tumor-específicos y para la activación de macrófagos. RE: retículo endoplásmico; IFN- β : interferón; ICAM-1: molécula de adhesión intercelular; MHC: complejo principal de histocompatibilidad; LFA-3: antígeno asociado a función de linfocito; RANTES: expresado y secretado en célula T normal, regulado en activación; IP-10: proteína 10 inducida por IFN γ ; ADA: adenosina deaminasa; iNOS: óxido nítrico sintasa inducible; TNF- α : factor de necrosis tumoral; TRAIL: ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF (Adaptado de Zamarin et al, 2012).

1.7- Experiencia clínica con diferentes cepas de NDV

Las cepas de NDV que han sido más ampliamente evaluadas para el tratamiento de neoplasmas humanos son la cepa no lítica Ulster, así como las cepas líticas MTH68/H, PV-701 y 73-T. Diferentes cepas del virus pueden mostrar varios grados de efectos citotóxicos y producción viral. Cuando una cepa NDV no lítica se usa para infectar células tumorales de monocapa, se observa la producción de partículas virales no infecciosas; en contraste, las cepas líticas de NDV causan la producción de partículas que pueden infectar a otras células tumorales, lo que conduce a una amplificación de la carga viral. Además, la infección de las cepas líticas de NDV da como resultado la promoción de sincitia y generación de placas en la monocapa de células tumorales. La cepa no lítica Ulster, mostró efectos citotóxicos más fuertes contra el carcinoma de colon; por el contrario, la cepa lítica Italien causó la muerte efectiva de melanomas humanos. (Schirrmacher et al, 2001).

Oncolisados con la cepa NDV 73-T. Desde mediados de la década de 1950 el oncolisado de NDV, usando explantes primarios de células tumorales humanas incubadas con NDV, comenzó a administrarse a pacientes de cáncer (Cassel et al, 1977). El oncolisado funcionaba para aumentar la respuesta inmunológica antitumoral hacia la enfermedad metastática. La administración del oncolisado a los pacientes resultó en un aumento de porcentaje de linfocitos T y citotoxicidad potenciada. Inicialmente, el oncolisado viral se preparó utilizando la cepa lítica NDV 73-T (Cassel y Garrett 1965). El virus se obtuvo mediante pases de la cepa NDV 379-SI en células de tumor ascítico Ehrlich *in vitro* 73 veces e *in vivo* 13 veces, con la finalidad de eliminar las propiedades neurotróficas de la cepa. El NDV 73-T tiene la capacidad de replicarse en células tumorales humanas, causando fusión célula-célula, formación de sincitia y muerte de células tumorales (Reichard et al, 1992). *In vitro*, el virus puede matar muchas células cancerosas humanas, como fibrosarcoma, osteosarcoma,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

neuroblastoma, carcinoma cervical, tumor de Wilm, etc. (Lorence et al, 1994). Además, la potencia oncolítica de la cepa NDV 73-T se demostró en ratones con modelos de xenoinjerto de tumor humano. La administración intratumoral e intraperitoneal de NDV 73-T causó regresión duradera y completa del tumor en ratones atímicos con neuroblastomas humanos y xenoinjertos de fibrosarcoma (Lorence et al, 1994). Otro estudio de Phuangsab et al. (2001) mostró que el virus administrado localmente podía inhibir el crecimiento del tumor (77-96%) en varios xenoinjertos de carcinoma en ratones, incluyendo cáncer de epidermoide, colon, pulmón, mama y xenoinjertos de próstata. Además, la regresión del tumor se observó en 9 de 12 ratones con xenoinjertos de neuroblastoma IMR-32, después de una sola inyección intraperitoneal de NDV. Lo más importante de todo, esta cepa no causa ningún efecto adverso en las células humanas normales (Lorence et al, 1994).

El primer registro clínico de la actividad de NDV fue informado por Cassel y Garrett (1965), que implicó una paciente con cáncer cervical. En este documento, las partículas virales (2.4×10^{12}) fueron inyectadas directamente en el tumor, demostrando la regresión intratumoral del cáncer local y también un nódulo linfático maligno distante (Cassel y Garrett 1965). Necrosis parcial y desprendimientos se observaron, pero esto fue seguido por un rebrote del tumor. Después de este estudio, un ensayo clínico de fase II con la administración de oncolisados virales se realizó para pacientes con melanoma maligno. Como resultado, 6 de 13 pacientes mostraron una disminución en el tamaño de los nódulos de la piel y/o lesiones de ganglios linfáticos (Revisado por Lam et al, 2011).

Adicionalmente, en otro ensayo clínico de fase II de seguimiento de 15 años, iniciado en 1975, en pacientes con estadio maligno III, el melanoma tratado con oncolisado de NDV indicó más de 60% de supervivencia a diez años, sin ningún efecto adverso. Continuando el análisis del ensayo, mostró el 55% supervivencia a los quince años. Se observó una supervivencia prolongada entre los pacientes que mostraron un aumento en el número de linfocitos T $CD8^+ CD56^+$, ya que estas células proporcionan una defensa inmune efectiva contra las células tumorales. Además, del aumento de células también se produjeron grandes cantidades de citocinas, como $TNF-\alpha$ e $IFN-\gamma$, para ayudar a la citotoxicidad (Revisado por Lam et al, 2011).

Vacuna autóloga de células tumorales (ATV) con NDV Ulster. Además de los oncolisados de NDV, una nueva estrategia para el diseño de una vacuna contra tumores de humano fue desarrollada por Liebrich et al, (1991). La vacuna tumoral consistió en un derivado autólogo del paciente con células tumorales vivas inactivadas por irradiación y luego infectadas por la cepa no lítica NDV Ulster. Luego, la vacuna es

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

almacenada en nitrógeno líquido hasta su aplicación. La idea de una vacuna autóloga de células tumorales (ATV) provino del estudio de células Esb modificadas con virus para tratar linfoma en modelos animales (Heicappell et al, 1986; Schirmmacher y Heicappell 1987). La modificación viral conduce a un aumento de la inmunogenicidad de la célula tumoral. La vacuna se usó como desafío para una nueva estrategia de terapia antimetastásica, ya que la quimioterapia se volvió menos efectiva. La vacunación posoperatoria con las células ESb modificadas con virus podían proteger contra metástasis en más del 50% de los ratones singénicos. Los ratones sobrevivientes desarrollaron inmunidad protectora de larga duración hacia el linfoma, debido a la memoria de las células T. Schild et al, (1989) había descrito la mejora de actividad inmune de las células T, después de la inmunización usando células tumorales modificadas con NDV. Además, la producción de citocinas, tales como IL-2 e IFN- α/β , se incrementó después de la estimulación. Estas citocinas fueron esenciales para la generación de actividad CTL tumor-específica (von Hoegen et al 1990; revisado por Lam et al, 2011)

La cepa Ulster tiene un ciclo de replicación abortiva monocíclica en células tumorales (Schirmmacher et al, 1999). El virus primero se adsorbe en las células tumorales, tomando alrededor de una hora para la unión. El virus permanece en el cuerpo durante una generación para una respuesta inmune efectiva, muy probablemente por inmunidad mediada por células T. El contacto directo del virus con las células inmunes afectará la proliferación celular y el estado de activación. Como la replicación viral lleva aproximadamente de 10 a 50 horas en las células tumorales, es suficiente para la generación de respuestas dérmicas tipo-retardadas de hipersensibilidad (DTH).

Clínicamente, el ATV-NDV se probó en 23 pacientes con metástasis hepáticas-colorrectales. La vacunación se aplicó a los pacientes después de someterse a resección hepática (Liebrich et al, 1991). Como resultado, los pacientes mostraron un aumento en los intervalos sin recurrencia y reactividad de la piel DTH. En otro estudio, resultados favorables se obtuvieron mediante el uso de ATV-NDV, que comprende una dosis de 1×10^7 células tumorales colorrectales humanas junto con 32 unidades de hemaglutinación (HU) de NDV, por vía intracutánea administrado a pacientes con cáncer colorrectal (Bohle et al 1990). Después de cuatro vacunaciones en intervalos de dos semanas, las respuestas DTH fueron aumentado en sitios distantes. Esto indicó un aumento de linfocitos T reactivos al tumor.

El estudio fue continuado por un ensayo clínico en 20 pacientes con cáncer colorrectal después de la resección quirúrgica del tumor (Lehner et al, 1990). La

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

vacuna ATV-NDV fue preparada con diferentes números de células tumorales que van desde 2×10^6 hasta 2×10^7 células y concentraciones de NDV de 4 a 64 HU. En general, 16 pacientes respondieron con una respuesta cutánea DTH después de la vacunación. Después de 24 horas, reacciones óptimas de la piel se observaron con 1×10^7 células tumorales infectadas con 32 HU de NDV Ulster (Lehner et al, 1990; Schlag et al, 1992). Esto significa que, la presencia de bajas cantidades de antígeno fue suficiente para inducir respuesta inmune de memoria local en pacientes con cáncer. Después, el ensayo clínico fase II se llevó a cabo por inmunización específica-activa (ASI) postoperatoria con ATV-NDV a 23 pacientes con carcinoma colorrectal, después de la resección de metástasis hepáticas (Schlag et al, 1992). Se obtuvieron resultados alentadores cuando el grupo de vacunados experimentó menor tasa de recurrencia, en comparación con un grupo control histórico.

La calidad de la vacuna ATV-NDV es crítica para la eficacia antitumoral. Esto fue probado en el estudio por Schirmmacher (2005), ya que la vacuna de alta calidad mostró 36% más eficacia que la de baja calidad, en términos de tasa de supervivencia a cinco años en un estudio avanzado de cáncer de mama. Ockert et al, (1996) modificó el paso de preparación de la vacuna mediante el enriquecimiento de las células tumorales a través de la centrifugación con Percoll, seguida de la eliminación de leucocitos infiltrantes de tumor (TIL) usando perlas inmunomagnéticas. Además, la mejora de la eficacia antitumoral de la vacuna ATV-NDV pudo lograrse de otra manera, por la adición de IL-2 recombinante (Pomer et al, 1995; Karcher et al, 2004). Pacientes vacunados se beneficiaron con una mejor tasa de supervivencia, con tres y cinco años como tasa de supervivencia de 67% y 61%, respectivamente. Un número significativo de pacientes ha aumentado los linfocitos T tumor-específico, incluso después de 5 a 6 años después de la vacunación, confirmando así inmunidad antitumoral. En otro estudio, la eficacia antitumoral de ATV-NDV se mejoró con la ayuda de anticuerpos híbridos biespecíficos recombinantes (Haas et al, 1998). La vacuna ATV-NDV recubierta con anticuerpos provocó la regulación positiva de marcadores de activación (CD3 y CD28) en células T dentro de las 24 horas.

En resumen, la vacuna ATV-NDV pareció ser factible y segura para tratar cánceres avanzados como el cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de ovario, glioblastoma, cáncer de riñón y cáncer de cabeza y cuello. Esfuerzos continuos para la mejora de la calidad de la vacuna tumoral se llevan a cabo con el fin de mejorar el pronóstico para la supervivencia de pacientes vacunados (Lam et al, 2011).

Cepa NDV PV701. La cepa PV701 no es recombinante, presenta replicación-competente y fue aislada por investigadores de Pro-Virus Inc. (Gaithersburg, USA). Es

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

una cepa naturalmente atenuada, aislado de una purificación de triple placa de la cepa NDV MK107 mesogénica. La actividad oncolítica de amplio espectro de esta cepa de virus es probablemente debido a defectos específicos del tumor en la respuesta antiviral mediada por IFN. Esta cepa de NDV se considera tumor selectiva, ya que es sensible a la mayoría de las líneas celulares de cáncer humano, destacando una sensibilidad de dos a cuatro órdenes logarítmicos que a células normales (Pecora et al, 2002). El efecto oncolítico de la cepa NDV PV701 se indicó en el estudio de Lorence et al, (2011). La administración intravenosa de PV701, en un estudio de aumento de dosis en ratones con tumor, produjo regresiones parciales del tumor a dosis tan bajas como 6×10^5 unidades formadoras de placa (pfu). Más del 80% de los ratones desarrollaron regresiones completas del tumor en dosis de hasta 6×10^8 pfu. La respuesta antitumoral se asoció con evidencia de replicación viral.

Estos resultados alentadores llevaron a la iniciación de un ensayo clínico fase I para administrar por vía intravenosa la cepa PV701 a pacientes con cáncer sólidos avanzados. La administración intravenosa de la cepa NDV PV701 se realizó en 79 pacientes con tumores sólidos (Pecora et al, 2002). El virus causó la regresión de cánceres sólidos avanzados, sin toxicidad acumulada observada. Lamentablemente, una posible muerte relacionada con el tratamiento involucró un paciente con cáncer renal con metástasis pulmonar. El estudio *post mortem* reveló inflamación en los pulmones, lo que sugiere lisis tumoral rápida que lleva a comprometer la función pulmonar después de la vacunación (Pecora et al, 2002).

En este sentido, se requiere más trabajo para mejorar la tolerancia del paciente. Por lo tanto, después de la fase I de prueba, algunas modificaciones fueron realizados por Laurie et al, (2006). Como resultado, un paciente con carcinoma anal experimentó regresión tumoral y cuatro pacientes tuvieron estabilización de su enfermedad por más de 6 meses. Ante todo, una primera dosis de desensibilización permitió una mayor tolerancia a dosis más altas posteriores (Hotte et al, 2007; Lorence et al 2007). La evolución de dos estrategias complementarias, como la desensibilización y la infusión lenta, han llevado a una mejoría de la vacuna con toxicidad reducida. Hasta ahora, resultados favorables se observaron cuando se usa el virus para tratar diversos tipos de cáncer.

En general, los efectos secundarios leves observados fueron síntomas parecidos a la gripe, eventos adversos específicos del sitio del tumor y reacciones a la infusión (Pecora et al, 2002; Laurie et al, 2006; Lorence et al, 2007). Los efectos adversos fueron dosis dependiente. Otros efectos secundarios típicos observados en algunos pacientes fueron leucopenia y neutropenia. Ocasionalmente, la infección del

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

virus se asoció con trombocitopenia transitoria y fuga vascular difusa. La presencia de partículas virales se observó en el tejido tumoral de pacientes vacunados, pero no en el tejido cardíaco, pulmonar, renal, hepático o cerebral (Lorence et al, 2007; Lorence et al, 2011). Prácticamente, la mayoría de los pacientes vacunados desarrollaron anticuerpos neutralizantes contra la cepa de NDV PV701. Además, virus viable fue recuperado de la orina de los pacientes vacunados, y rara vez en esputo, pero el registro del virus no persistió y fue eliminado en 3 semanas.

NDV MTH-68/H derivada de la cepa Hertfordshire. La cepa mesogénica NDV Hertfordshire fue aislada en Inglaterra en 1933, y más tarde conocida como Herts'33. Estudios tempranos de Alexander et al, (1973) informaron la citopatogenicidad y producción de la progenie de NDV Herts'33 mediante tinción en líneas celulares animales. La infección del virus a bajas multiplicidades causó la fusión celular en 24 horas; mientras que a altas multiplicidades, los efectos fueron inducidos dentro de las 3 horas posteriores a la infección. Entre estas células, la replicación del virus ocurrió en células MDBK, células embrionarias de pollo y células de riñón de hamster bebé (BHK-21). Mientras tanto, NDV causó más lisis celular en células Madin-Darby de riñón bovino (MDBK), así como liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) en gran cantidad después de 24 horas de infección.

El primer uso intensivo de la cepa NDV Hertfordshire para el tratamiento del cáncer fue iniciado por Csatory (1971). Él desarrolló una nueva cepa del virus llamada MTH-68, que significa "More Than Hope 1968". Desde entonces, muchos investigadores comenzaron a investigar su capacidad contra el cáncer. La cepa MTH-68/H tiene la capacidad de causar regresiones significativas de líneas tumorales de humano en diversos grados, como en células PC12, MCF-7, HCT116, DU-145, HT-29, A431, HeLa y PC3. La activación de apoptosis inducida por caspasa-8 y 9 en las células infectadas por virus, independientemente de sus condiciones de p53 (Fabian et al, 2007). De hecho, MTH-68/H fue el inductor más potente de IFN- α entre todas las cepas de NDV probadas (Apostolidis et al, 2007). Además, esta cepa NDV también tiene la capacidad de inducir óxido nítrico (NO) y aumentar la población de macrófagos en ratas tratadas, lo que resulta en la mejora de los efectos antitumorales (Hrabak et al, 2006).

Clínicamente, en un ensayo controlado con placebo, vacunas MTH-68 fueron administradas a 33 pacientes con cánceres por inhalación dos veces a la semana. Respuestas favorables se produjeron en un total de 18 pacientes (55%) en comparación a 2 pacientes en el grupo placebo (solo 8%), ya que el tumor estable tuvo

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

una regresión (Csatory et al, 1993). Siete pacientes vacunados sobrevivieron más de 2 años, mientras que ninguno del grupo de control.

Un caso individual de vacunación de la cepa NDV MTH-68/H a un paciente de 14 años con glioblastoma de alto grado se informó en 1999. El paciente recibió quimioterapia adyuvante, después de la resección del tumor y radioterapia. La eliminación ineficaz del tumor obligó al paciente a recibir la vacuna de NDV. Durante ese tiempo, el paciente continuó recibiendo tamoxifen como adyuvante. Como resultado, el tumor se redujo en aproximadamente un 95% desde el escaneo, sin ningún efecto neurotóxico (Csatory et al, 1999). Este caso revolucionario de remisión completa de tumor indica que la vacuna NDV puede ser un potente tratamiento contra el cáncer.

Otras cepas NDV. La cepa NDV HUI (OV001) es una cepa lentogénica, altamente purificada, aislada de forma natural de una vacuna atenuada de la cepa NDV B1. Esta cepa tiene alta citopatogenicidad selectiva para las células cancerosas humanas y animales. La infección del virus conduce a la replicación viral y producción progenie del virus. Sin embargo, las progenies del virus producidas por esta cepa lentogénica no son infecciosas, debido a un procesamiento incompleto de la proteína de fusión (F). Además de efectos citotóxicos directos sobre las células diana, la cepa NDV HUI también induce eventos mediados por citocina y aumenta las reacciones inmunes (Freeman et al, 2006).

En un reciente ensayo de fase I/II, se administró la cepa NDV HUI por vía intravenosa a 11 pacientes con glioblastoma recurrente multiforme (GBM). Siguiendo el mantenimiento quincenal de la terapia, un paciente experimentó una enfermedad estable después del primer ciclo de vacunación; y luego, remisión completa tumoral con una duración de 3 meses. Esto podría deberse a que el paciente desarrolló anticuerpos neutralizantes en la etapa temprana. Normalmente, los anticuerpos neutralizantes aparecieron dentro de 5 a 29 días. El NDV infeccioso se recuperó de muestras de sangre, orina y saliva. La administración de la cepa HUI causó efectos secundarios leves a los pacientes, incluidos fiebre y dolor de cabeza grado I/II. A veces, los pacientes pueden experimentar problemas neurológicos y de trombosis. La administración intravenosa de la cepa NDV HUI es bien tolerada. Las respuestas alentadoras de la cepa HUI garantizan la evaluación de NDV en otros cánceres, además de GBM (Freeman et al, 2006).

Otra cepa lentogénica, LaSota también demostró inducir efectos citotóxicos antitumorales de macrófagos de ratón por la producción de TNF- α . La actividad anticancerígena de monocitos activados se atribuyó a TRAIL (Washburn et al, 2003).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

En el estudio de Liang et al, (2003), vacunación con la cepa NDV LaSota fue eficiente para prolongar la vida de pacientes con cáncer colorrectal, con 96% de supervivencia del paciente después de un año de tratamiento con NDV. Por otra parte, la cantidad de células NK aumentó, y la función inmune obviamente mejoró. Para la cepa NDV Italien, Ahlert y Schirmmacher (1990) mostraron que esta cepa lítica podría replicarse en diferentes células tumorales humanas, como el carcinoma de mama, pulmón, riñón, melanoma y linfoma. Una inyección intratumoral de NDV Italien muestra alta sensibilidad a los xenoinjertos de melanoma metastásico humano en ratones atímico (Schirmmacher et al, 2001). Hubo una dosis máxima tolerada (MTD) en ratones en el rango de 2,000 HU de NDV Italien (Bian et al, 2006). Sin embargo, la cepa no lítica Ulster mostró un efecto de citotoxicidad más fuerte en un modelo de colon con carcinoma CT26 (Schirmmacher et al, 2001). Esto sugiere que el efecto antitumoral sobre diferentes células tumorales se correlaciona con la virulencia del NDV. Es importante destacar que la replicación del virus NDV no ocurre en las células normales, incluidos los linfocitos T en reposo y células de hígado de pollo normales (Schirmmacher et al, 1999).

Cepas de NDV modificadas genéticamente. Recientemente, la eficacia antitumoral es mejorada con la nueva idea emergente de usar NDV recombinante con un gen terapéutico (Zamarin et al, 2012). Para mejorar las propiedades inmunoestimulantes de NDV, el gen IL-2 fue introducido en la secuencia codificante del virus (Janke et al, 2008; Vigil et al, 2007). Por lo tanto, la infección del virus conduce a la producción de IL-2 e inicia efectos inmunológicos, incluidas la activación de células T y producción de IFN- γ . *In vivo*, ratones portadores de carcinoma de colon fueron tratados con NDV-IL-2 recombinante y se mostró una regresión tumoral significativa e infiltración de células T. *Ex vivo*, el oncolisado de NDV-IL-2 dio como resultado la activación de CTL y células T de memoria tumor-específicas (Janke et al, 2008).

En otro estudio, Janke et al, (2007) insertó el gen del factor estimulante de colonias gránulo-macrófago (GM-CSF) como una unidad de transcripción adicional en NDV, con el fin de aumentar la inmunidad antitumoral. Co-cultivo con virus recombinante estimularon PBMC de humano para ejercer efectos antitumorales. Además, se observó una mayor síntesis de IFN- α , probablemente contribuido mayormente por monocitos activados y células dendríticas. Indirectamente, la inmunidad Th también se mejoró.

Por otro lado, la generación de un NDV recombinante que expresa la proteína NS1 del virus de la influenza, una proteína que presenta antagonismo contra IFN, fue

reportado. Como resultado, el virus mejoró su capacidad para formar sincitia y un efecto de lisis sobre las células tumorales de humano y modelos animales, lo que resultó en un mayor nivel general a largo plazo de supervivencia. Además, la vacunación de NDV recombinante condujo a un alto grado de infiltración de células T, sugiriendo la generación de la respuesta CTL tumor-específica (Zamarin et al, 2009).

Otra cepa recombinante de NDV fue diseñada por Bian et al, (2006) en el cual el virus fue modificado por preincubación con una proteína biespecífica recombinante (receptor IL-2). Se introdujo un nuevo sitio de unión al virus, que mejoró su interacción con los objetivos asociados al tumor. Se observó una mayor eficacia de replicación del virus en ratones singénicos portadores de tumores Eb-M7 (positivo a receptor IL-2). La administración de NDV modificado reveló que los efectos secundarios se redujeron sin afectar la actividad antitumoral. En conclusión, la cepa NDV genéticamente modificada puede tener no solo efecto antitumoral, sino también aumentando su efecto inmunomodulador (Figura 6). Un estudio previo demostró que el NDV recombinante tenía una alta eficiencia para producir efectos terapéuticos, sin afectar las actividades oncolíticas. Esto probó que el NDV es un vector altamente potente. Es importante destacar que el virus no causa patogenicidad en aves (Lam et al, 2011; Zamarin et al, 2012).

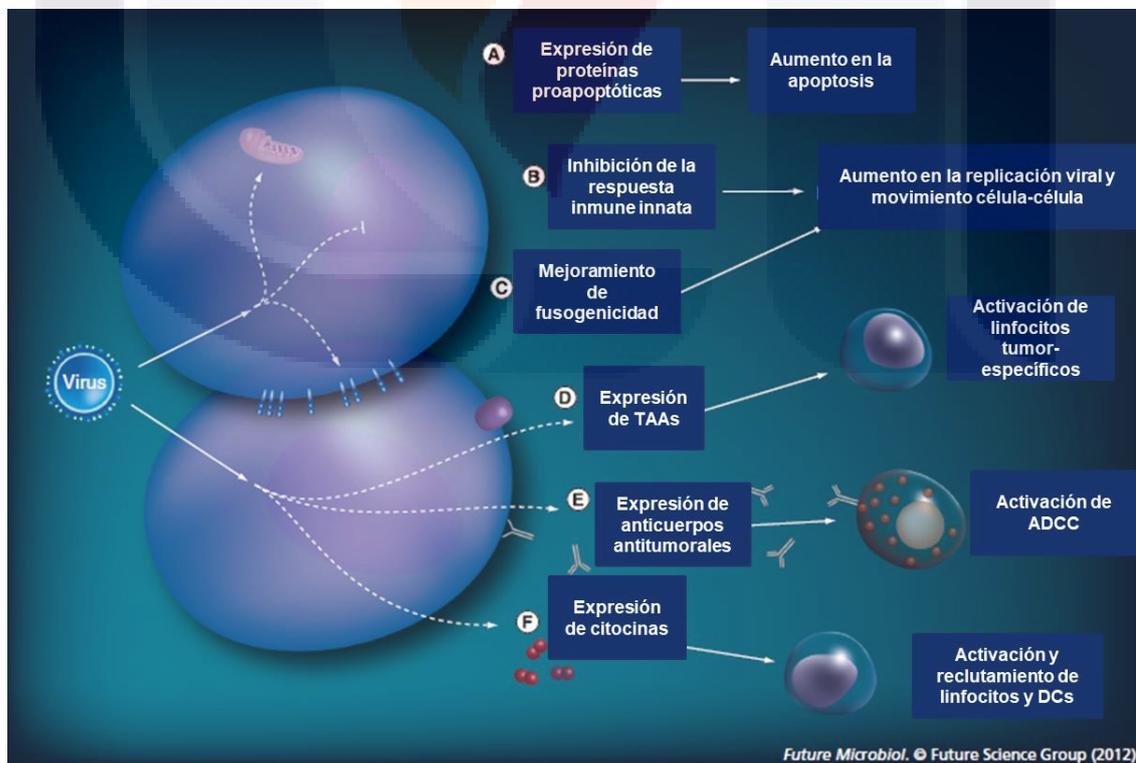


Figura 6. Estrategias empleadas para potenciar la actividad antitumoral del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) mediante ingeniería genética.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Muchas propuestas han demostrado mejorar la actividad antitumoral de NDV. Estas incluyen potenciar las propiedades citolíticas intrínsecas del virus mediante (A) incremento en la fusogenicidad; (B) inhibición de la respuesta inmune innata; y (C) la expresión de proteínas proapoptóticas; así como mejoramiento de los efectos antitumorales inmuno-modulados mediante (D) expresión de TAAs, llevando a la activación y expansión de linfocitos tumor-específicos; (E) expresión de anticuerpos dirigidos a tumor con activación de ADCC; y (F) expresión de citocinas inmunoestimuladoras, que conducen a la activación y reclutamiento de linfocitos y DCs. ADCC: Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo; DC: célula dendrítica; TAA: antígeno asociado a tumor (Adaptado de Zamarin et al, 2012).

1.8- Caracterización molecular de la cepa mexicana

APMV1/chicken/Mexico/P05/2005

El más reciente sistema de clasificación, propuesto por Czeglédi et al (2006), agrupa a los virus del género *Avulavirus* en dos grandes clases basado en tres categorías respecto al tamaño del genoma, que son 15198, 15186 o 15192 nucleótidos. La clase I incluye cepas de NDV con genomas de 15,198 nucleótidos, mientras que la clase II comprende dos tamaños de genomas, los genotipos I, II, III y IV contienen 15,186 nucleótidos; mientras que los genotipos V, VI, VII y VIII contienen 15,192 nucleótidos. Reportes previos de aislamientos en México han determinado que las apariciones más recurrentes pertenecen al genotipo V (Perozo et al, 2008; Merino et al 2009; Alexander, 1989). Recientemente, en México se aisló la cepa APMV1/chicken/Mexico/P05/2005, por lo que se denominó NDV P05, de un brote en una granja de gallinas que ocurrió a pesar de la campaña de vacunación y resultó en una caída significativa de la producción de huevo (Absalón et al, 2012). La secuenciación del genoma completo de NDV P05 reveló un tamaño de 15,192 pares de bases. El análisis filogenético reveló que la cepa P05 pertenece al genotipo V, y que está claramente más relacionada a la cepa Largo/71, hasta con un 97.4% de similitud (Figura 7). El análisis incluyó las secuencias genómicas parciales o completas de 77 virus pertenecientes a las clases I y II (genotipos I-IX) (Absalón et al, 2012). En el análisis destaca que la cepa NDV-P05 presenta una distancia filogenética considerable a cepas como LaSota, Ulster y Herts/33 pertenecientes a los genotipos II, I, y IV, respectivamente. Dichas cepas son las más usadas como tratamiento para cáncer en humanos o en modelos animales (revisado por Lam et al, 2011 y Zamarin et al, 2012).

En relevancia para nuestro estudio, es importante destacar que a la fecha no se ha reportado el uso de cepas del genotipo V como agentes antitumorales, por lo que nos parece interesante explorar la capacidad antitumoral e inmunoestimulante de la recién descrita cepa NDV-P05. Sin embargo, el uso de una cepa velogénica aislada de un brote en México, podría representar un riesgo potencial de liberación al ambiente del virus, por lo que para nuestro estudio hicimos uso de la misma cepa pero

atenuada por recombinación y la cual se usa en la actualidad como una vacuna comercial, lo cual la hace totalmente segura para la realización del estudio. La generación de esta vacuna recombinante, denominada rNDV-P05, fue generada por el mismo grupo que secuenció y caracterizó el genoma del virus NDV-P05 (Garzón- Morales et al 2013).

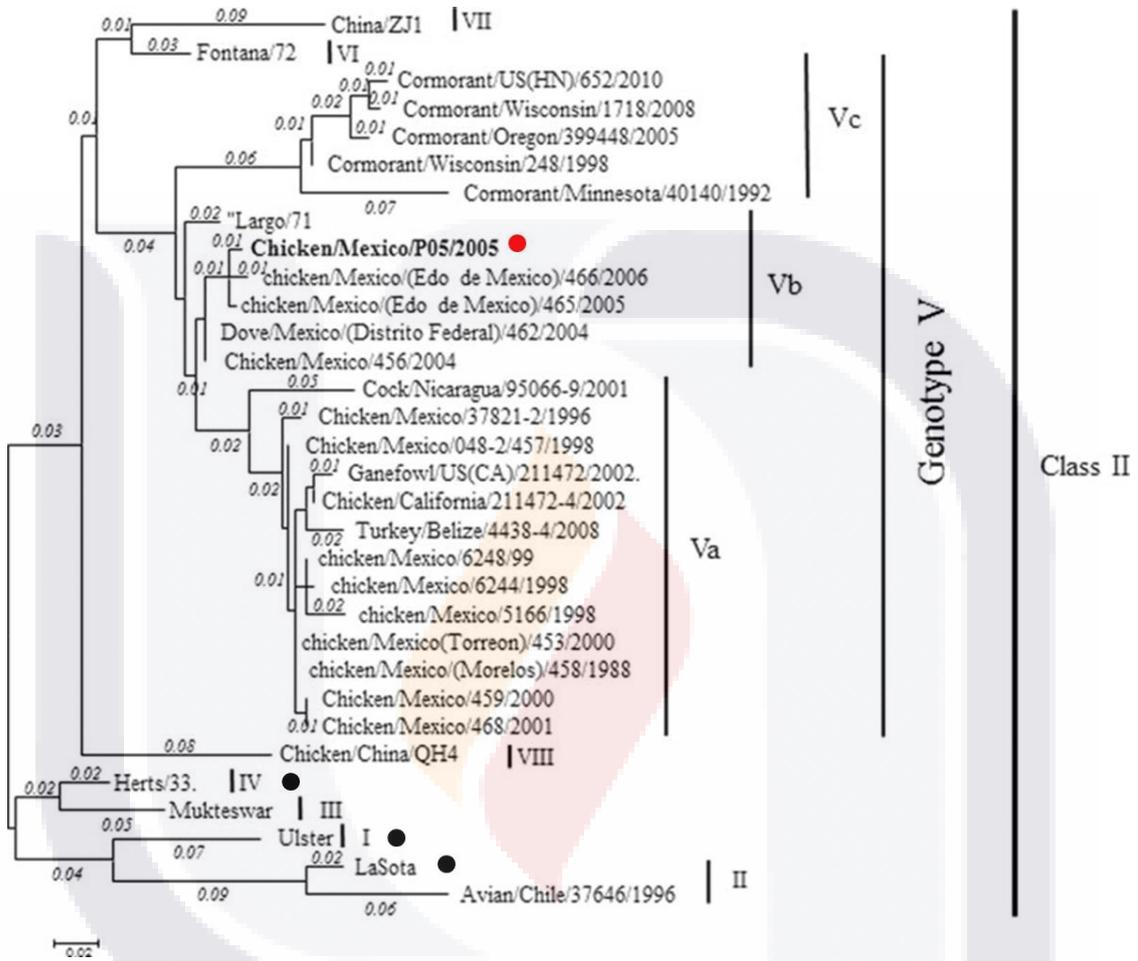


Figura 7. Analisis filogenético del genoma parcial o completo de diferentes cepas del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV).

Se muestra la clasificación de las diferentes cepas dentro de la Clase II, y en esta ultima dentro de los genotipos I-IX. El círculo rojo señala la cepa NDV P05 dentro del genotipo V, los círculos negros resaltan las cepas descritas con actividad antitumoral (Adaptado de Absalón et al, 2012).

2- JUSTIFICACIÓN.

Los virus oncolíticos son virus que tiene la habilidad de matar células cancerígenas sin dañar significativamente las células normales y han sido usados en el tratamiento contra el cáncer desde inicios de los 50's. Estos virus tienen también una fuerte actividad inmunoestimuladora. Como ejemplo está el NDV, el cual pertenece a la familia Paramyxoviridae e infecta prácticamente a todas las especies de aves. El NDV ya ha sido utilizado para el tratamiento de pacientes con cáncer, debido a tres factores clave: (i) replicación selectiva en células tumorales y perfil seguro, (ii) el potencial oncolítico y (iii) las propiedades inmunoestimulantes. El NDV es conocido por generar una fuerte respuesta inmune por la inducción de proteínas anti-virales (citocinas) tales como diferentes interferones ($\text{IFN-}\alpha/\text{IFN-}\beta$), factores de necrosis tumoral ($\text{TNF-}\alpha$) e interleucinas (IL-1), las cuales llevan a la activación de células NK, macrófagos y células T sensibilizadas específicas. Aunado a lo anterior, es importante resaltar que el efecto antitumoral e inmunoestimulante del NDV está ampliamente ligado a la cepa que se use en la terapia.

Parte del mecanismo antitumoral e inmunomodulador del NDV está mediado por las proteínas de la membrana, la HN y la F, las cuales son dirigidas hacia la superficie de las células tumorales infectadas por el virus. La inducción de la actividad co-estimuladora de células T y la producción de citocinas potencia la expresión de antígenos tumorales específicos, lo cual resulta en una respuesta anti-tumoral específica. Estudios previos han mostrado que el solo uso de la proteína HN es capaz de estimular actividad inmune innata, involucrando células NK, $\text{INF-}\alpha$ y ligandos TRAIL en células mononucleares, resultando en una fuerte actividad oncolítica. Además, también se ha estudiado la capacidad de inducir apoptosis de la proteína HN cuando es expresada y retenida en el citoplasma o en la membrana celular, o bien exocitada al medio extracelular, donde para esta última se observaron resultados similares a la de la proteína anclada a membrana. Este hecho revela que no es del todo necesaria la expresión de la proteína HN en la célula infectada para observar un efecto, sino que la proteína soluble (secretada, no-anclada) es incluso capaz de activar una respuesta antitumoral, abriendo con ello la oportunidad de implementar una terapia con el uso de la proteína HN administrada de manera externa, lo cual implica también, su producción en algún sistema heterólogo económico y altamente productivo.

Además, el estancamiento en el uso de los sistemas tradicionales de producción de virus basados en huevos de gallina, cuya capacidad limitada ha sido evidenciada en años recientes, ha detonado la incansable búsqueda en torno al

desarrollo de sistemas eficientes y económicos para la producción de vacunas y terapéuticos, donde los sistemas basados en plantas han demostrado que las proteínas heterólogas expresadas en plantas, tienen una correcta traducción, modificaciones postraduccionales y plegamiento, lo cual cobra gran relevancia al momento de llevar a cabo estudios biológicos donde se pretenda sacar provecho de la actividad nativa de la proteína que se esté expresando.

En este contexto, el presente estudio pretende evaluar dos incógnitas: la primera implica determinar si la actividad biológica de uno de los principales elementos inmunogénicos del NDV, la glicoproteína HN producida en plantas de *Nicotiana benthamiana*, se mantiene después de su purificación. Con ello, se tendría una versión soluble (no anclada a membrana) de dicha proteína, con lo que se podría validar la actividad antitumoral e inmunoestimulante de dicha proteína viral sin la necesidad de ser expresada por la célula hospedante del NDV; la segunda, consiste en caracterizar fisicoquímicamente y determinar la capacidad antitumoral e inmunoestimuladora de una cepa mexicana, rNDV-P05, de reciente descripción, la cual pertenece al genotipo V y para la cual no se ha reportado hasta la fecha algún trabajo que describa dichas características que se pretenden determinar en este estudio.

3- HIPÓTESIS.

La vacuna atenuada recombinantemente del NDV (rNDV-P05), presenta actividad antitumoral e inmunoestimuladora *in vitro* y/o *in vivo*.

Es posible expresar y purificar la proteína HN, en plantas de *Nicotiana benthamiana*.

4- OBJETIVO GENERAL.

Estudiar la actividad antitumoral e inmunoestimuladora de una vacuna atenuada recombinantemente del NDV.

4.1- Objetivos Particulares

4.1.1 Establecer un sistema de producción y purificación de la proteína HN en plantas de tabaco.

4.1.2 Evaluar la actividad biológica de una vacuna atenuada recombinantemente del NDV.

4.1.3 Establecer cultivos *in vitro* de diferentes líneas tumorales y evaluar la actividad antitumoral de una vacuna atenuada recombinantemente del NDV.

4.1.4 Evaluar la capacidad inmunoestimuladora de una vacuna atenuada recombinantemente del NDV.

4.1.5 Analizar la capacidad antitumoral de una vacuna atenuada recombinantemente del NDV *in vivo*.

5- METODOLOGÍA.

5.1- Expresión transitoria de la proteína HN en hojas cosechadas de *Nicotiana benthamiana*.

Se crecieron en agitación (250 rpm) a 28 °C por 48 h en medio Luria-Bertani (LB; Bertani et al, 1951), suplementado con antibióticos apropiados (TRBO:HNop1= rifampicina (Sigma-Aldrich) 10µg/ml, tetraciclina (Sigma-Aldrich) 10µg/ml, kanamicina (Sigma-Aldrich) 50µg/ml; p19= tetraciclina 10µg/ml y gentamicina 20µg/ml), las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 y C58, que contenían las construcciones TRBO:HNop1 y p19, respectivamente. La construcción TRBO:HNop1, codifica para la proteína HN del NDV, mientras que la construcción p19 codifica para una proteína del mismo nombre con actividad inhibidora del silenciamiento post-transcripcional. (Figura 8: 1 y 2) mediante la inactivación de ARNs pequeños de interferencia (Lakatos et al, 2004), y que además ya se ha reportado que ayuda a la sobre producción de proteínas heterólogas en plantas (Arzola et al, 2011). Después, las bacterias se centrifugaron 20 minutos a 3,300 x g/temperatura ambiente (Figura 8: 3 y 4) y luego se resuspendieron en buffer de infiltración (MES 10mM pH5.6, MgCl₂ 10mM, acetosiringona 150µM y Tween 20 0.01%) y se ajustó a una OD_{600nm} igual a uno para ambas cepas (Figura 8: 5 y 6). Luego se dejó de 3-5 h en incubación, a temperatura ambiente, la suspensión de bacterias y se mezclaron en una proporción 1:1 ambas cepas antes de la agroinfiltración (Figura 8: 7 y 8). Como control negativo se infiltró con el buffer de infiltración. Tres hojas de *N. benthamiana* se usaron para cada tratamiento (Figura 8: 8). Las hojas se cortaron del tallo de la planta, se lavaron a fondo, se sumergieron en la suspensión de bacterias y se colocaron en una cámara de vacío. El vacío se ajustó a 27" Hg durante 1-2 minutos y luego se liberó rápidamente (Figura 8: 9). Una vez infiltradas, las hojas se retiraron de la solución y se dejaron a secar a temperatura ambiente durante 45-60 minutos (Figura 8: 10). A continuación, se colocaron en una caja de plástico con una capa de 2 cm de perlita empapada de agua (Figura 8: 11) y se incubaron a 20 °C en la oscuridad por 6 días (Figura 8: 12). La representación esquemática del proceso de producción de la proteína HN se puede ver en la figura 8.

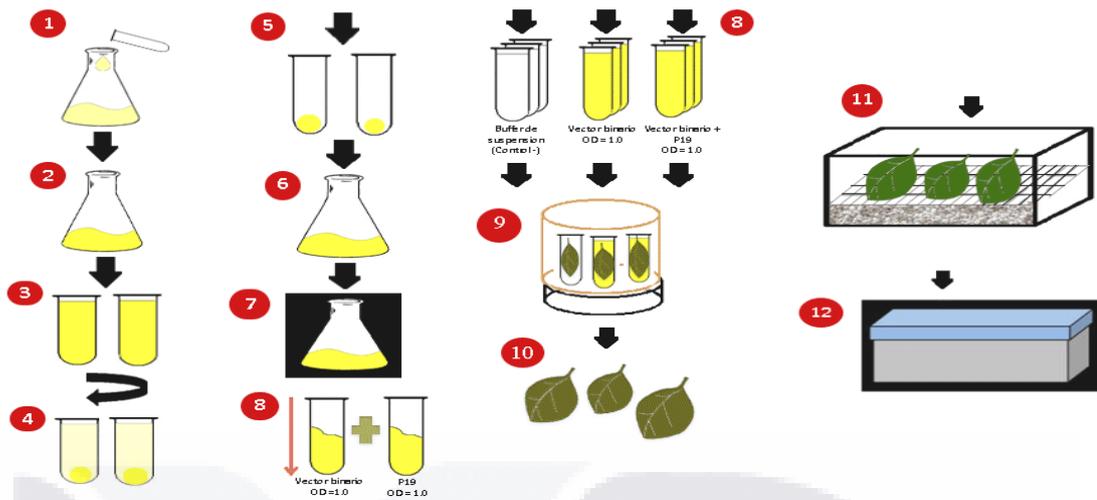


Figura 8. Esquema representativo del proceso de agroinfiltración.

Se muestran los pasos que se siguieron para la expresión transitoria de la proteína HN en hojas cosechadas de *N. benthamiana*, tal y como se referencia en el texto.

5.2- Extracción, purificación y cuantificación de la proteína HN expresada

Después de 6 días post-infiltración, la extracción de la proteína HN se realizó utilizando el buffer de fosfatos salino (PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10.1 mM, Na₂HPO₄ y 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4). Se añadió PBS enfriado previamente a las hojas agroinfiltradas en una proporción de 10 µl de buffer por cada miligramo de muestra fresca (10µl/mg). Las hojas fueron pulverizadas mediante mortero y pistilo en condiciones de esterilidad y frío. Después de la homogenización de las hojas, se sometió a centrifugación a 10,000 x g durante 20 minutos/4 °C, y el sobrenadante fue recolectado en un tubo estéril nuevo. La purificación de la proteína HN se llevó a cabo usando el kit comercial ANTI-FLAG® M2 Magnetic Beads (Sigma-Aldrich), debido a que la proteína recombinante posee en su extremo N-terminal la secuencia de aminoácidos FLAG® (DYKDDDDK) en triplicado. La prueba directa de inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) se utilizó para cuantificar la cantidad de proteína HN expresada en plantas. Para ello, microplacas de 96 pozos se recubrieron con muestras y controles negativos (extracto *N. benthamiana* sin HN) diluidos 1:5 en buffer PBS pH 7.4, así como para cada microplaca se generó una curva patrón (5000; 1666.7; 555.6; 185.2; 61.7; 20.6; 6.9; y 2.3 ng/ml) con la proteína de fusión C terminal FLAG–BAP™ (Sigma-Aldrich) diluida en PBS, la cual contiene el mismo motivo proteico que la proteína HN (DYKDDDDK). Por cada pozo se cargaron 50 µl de cada muestra y controles por triplicado y después se incubó durante 1h a 37 °C. La placa se lavó con una mezcla de PBS-Tween20® 0,05% por cuatro veces para eliminar el exceso de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

muestras y controles. El bloqueo se consiguió mediante 15 minutos de incubación con leche sin grasa al 5% (Svelty) diluido en PBS. La placa se enjuagó nuevamente con una mezcla de PBS/Tween 0,05%. Después, se añadió el anticuerpo anti-FLAG conjugado con HRP (Sigma-Aldrich) diluido 1:2000 en PBS a cada pozo y posteriormente la placa fue incubada a 37° C por una hora. La detección se realizó con el sustrato TMB (3, 3', 5, 5' tetrametilbencidina (Sigma-Aldrich). Después de 10 minutos se detuvo la reacción con 50 µl de HCl 1N por pocillo y se midió inmediatamente la absorbancia a 450 nm en un lector de microplaca iMark™ (Bio-Rad Laboratories, Tokyo, Japan).

5.3- Precipitación de proteínas

Como método alternativo para la purificación parcial de la proteína HN se usó la precipitación de proteínas por Metanol/Cloroformo. Todas las muestras usadas correspondían a 10ml de extracto de *N. benthamiana* filtrado (Millipore 0.22µm, para eliminar células de *Agrobacterium*) con la proteína recombinante (HN 1.1µg/ml), el cual se liofilizó y resuspendió en 1ml de agua destilada (dH₂O). Para la precipitación se tomó el mililitro de muestra anterior y se le añadieron 4ml de metanol, se mezcló por vortex por 1 minuto y luego se añadió 1ml de cloroformo y de nuevo se mezcló por vortex 1 minuto. Después se añadieron 3ml de dH₂O y se homogenizó por vortex por 1 minuto. Inmediatamente después se centrifugó a 3,300 x g/5 minutos/20 °C (Hermle Z383K). Una vez formada una capa fina (proteínas) entre la fase acuosa (sobrenadante) y la fase hidrofóbica, el sobrenadante se retiró y se añadió nuevamente 4 ml de metanol. Luego se mezcló por vortex y se centrifugó a 3,300 x g/5 minutos/20 °C. Finalmente, se obtuvo una pastilla al fondo (proteínas) y el sobrenadante se retiró sin tocar la pastilla, mientras que el solvente restante se eliminó por evaporación a temperatura ambiente. La pastilla seca se solubilizó en dH₂O o en buffer TBS y se cuantificó la cantidad de proteína HN mediante la técnica de ELISA anteriormente descrita.

5.4- Separación microsomal por centrifugación

Para determinar si la proteína HN expresada en las células vegetales estaba siendo capturada o retenida en fracciones microsomales (ej. retículo endoplásmico) se utilizó el protocolo planteado por Abas y Luschnig (2010) con algunas modificaciones. Así también, se buscó demostrar si al filtrar la muestra de *N. benthamiana* previo al proceso de fraccionamiento se perdía proteína recombinante. En resumen, se tomaron 500µl de muestra filtrada (Millipore 0.22µm) o sin filtrar, correspondiente a 50mg de tejido vegetal y se mezcló por completo con 450µl de sacarosa (0.8M) y con 50µl de

glicerol (5%). En orden de eliminar organelos grandes (ej. núcleo) y células enteras, a lo cual se denominó “debris”, se centrifugó a 2,000 x g/3 minutos/4 °C obteniéndose una pastilla, la cual se resuspendió en 50µl de buffer PBS y se guardó a -20°C hasta su análisis, mientras que el sobrenadante se siguió usando en los pasos siguientes. El sobrenadante del paso anterior, el cual contiene la fracción microsomal, se diluyó en un volumen de dH₂O y se centrifugó a 10,000 x g/2 h/4 °C. Finalmente, se formaron dos fracciones, una compuesta por proteínas solubles a la cual se denominó “sobrenadante” y la otra en forma de pastilla denominada como “microsomos”. Ambas se separaron y almacenaron a -20°C hasta su análisis. La fracción “microsomos” se resuspendió en 50µl de PBS antes de almacenarse. Todas las fracciones se analizaron mediante ELISA para determinar la concentración de proteína HN en cada una.

5.5- Expresión y purificación de la proteína HN en plantas completas de *N. benthamiana*.

5.5.1- Transformación de *Agrobacterium*. Como primer objetivo particular se planteó la transformación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa GV3101) con dos diferentes construcciones de la proteína Hemaglutinina-neuraminidasa (HN), tanto en su versión nativa como una versión modificada con dos secuencias “tag” (His-tag y 54-tag) en la posición C-terminal. Además, para la construcción con secuencias tag se eliminó la secuencia que codifica para un dominio transmembranal y una cola citoplásmica, con lo que se pretendía obtener una versión no-anclada o soluble (Figura 9). Las dos construcciones se clonaron en el vector binario pTRACKc, entre secuencias promotoras y terminadoras 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), así como con una secuencia potenciadora (5'-UTR) de la enzima chalcona sintetasa.

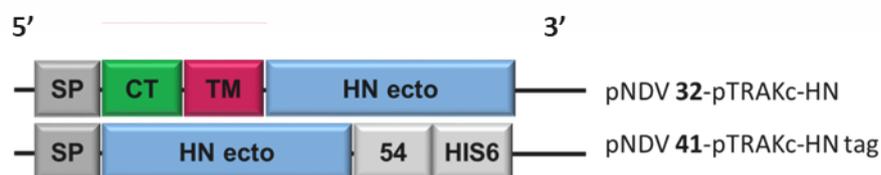


Figura 9. Esquema representativo, no a escala, de las construcciones utilizadas.

Para cada gene del NDV se utilizaron las secuencias cDNA de la cepa mexicana del NDV P05 (GenBank número de acceso= HM117720). SP= péptido señal hacia apoplasto; CT= cola citoplásmica; TM= dominio transmembranal; HN ecto= ectodominio de la proteína HN; HIS6= Histidina tag 6x; 54= secuencia 54 tag. Todas las construcciones son expresadas bajo el

control del promotor constitutivo y del terminador 35S, del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), así como de una secuencia potenciadora (5'-UTR) de la enzima chalcona sintetasa.

La transformación de células de *A. tumefaciens* fue llevada a cabo mediante electroporación. En breve, células competentes fueron incubadas, en hielo, con 1 µg de DNA plasmídico correspondiente a cada una de las dos construcciones. Después fueron transferidas a una cubeta de electroporación fría y se les electroporó (2.5 kV, constante de tiempo= 5.5-5.6). Inmediatamente, un mililitro de medio SOC (caldo superóptimo; 2 % de triptona, 0,5 % de extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄ y 20 mM de glucosa) se añadió y se dejó incubar por 1 h a 28 °C/160 rpm. Después de eso, se inocularon cajas con medio YEB (caldo extracto de levadura; 0.5% extracto de carne, 0.1% extracto de levadura, 0.5% peptona, 0.5% sacarosa y 10 mM de MgSO₄) con antibióticos (rifampicina 25µg/ml + kanamicina 25µg/ml + carbencilina 50µg/ml) y se incubaron a 28 °C hasta que se apreciaron las colonias. Una vez que colonias bien diferenciadas crecieron, se tomaron cuatro colonias por cada construcción con una punta y se inocularon en cajas de medio YEB con los mismos antibióticos, y se incubaron a 28 °C por 24 h. Al mismo tiempo, cada colonia fue evaluada por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mezclando la punta con la que se tomaron las colonias con una solución de 25µl de PCR Master mix (PCR buffer 1x; dNTP-mix 0.4mM; MgCl₂ 0.08mM; primers 0.4pM; Taq polimerasa 0.1 U/µl). Luego, se corrieron las muestras en las siguientes condiciones de PCR: Desnaturalización inicial 95 °C/3 minutos/1 ciclo; desnaturalización 95 °C/0.5 minutos/30 ciclos; alineamiento 51 °C/0.5 minutos/30 ciclos; extensión 72 °C/2.5 minutos/30 ciclos; y extensión final 72 °C/5 minutos/1 ciclo. Los productos de PCR se visualizaron al cargarlos en un gel de agarosa 1.2 % (Sub-Cell® GT Cell, Bio-Rad) y correrlos a 120 V/20-40 minutos (PowerPac™, Bio-Rad). Como control positivo y negativo se usaron DNA plasmídico de cada construcción y PCR master mix, respectivamente. Después de eso, se tomaron imágenes de los geles usando un transluminador con luz UV (Gel Doc™ EZ System, Bio-Rad).

Las colonias que amplificaron el tamaño de banda esperado para cada construcción, se inocularon en 5ml de medio YEB (kanamicina 25µg/ml + carbencilina 50µg/ml) y se incubaron 28 °C/160 rpm/24 h. Después, se añadieron 5ml del mismo medio al cultivo y se incubaron por 24 h más. Finalmente, el cultivo de 48 h fue centrifugado a 3,000 x g/10 minutos y la pastilla celular se resuspendió en 3ml de medio YEB sin antibióticos. Se mezcló 1ml de cultivo con 400µl de glicerol 100% y se guardaron los stocks de glicerol a -80 °C hasta su uso.

5.5.2- Cultivo de Agrobacterium, infiltración de *Nicotiana benthamiana* y muestreo. Para la expresión transitoria de las diferentes construcciones (Figura 9) en plantas de *N. benthamiana* (6-7 semanas de edad) se usaron los stocks de glicerol guardados a -80 °C. Se inocularon ~100µl de cada agrobacteria transformada con cada construcción en 5ml de medio YEB (kanamicina 25µg/ml + carbencilina 50µg/ml) y se incubaron a 28 °C/160 rpm/24 h. Adicionalmente, se incubaron de igual forma una agrobacteria transformada con el gen que codifica para la proteína rojo fluorescente (rfp) como control interno para la infiltración, y una agrobacteria con un gen que codifica para una proteína de inhibición de silenciamiento post-transcripcional (p19), la cual se coinfiltró con las construcciones para incrementar la expresión de las proteínas de interés como ya se mencionó en el apartado 5.1. Pasadas las primeras 24 h de incubación, se reinoculó con ~200µl del cultivo en 20ml de medio PAM (medio para *Agrobacterium* de peptona vegetal; 0.1% extracto de levadura, 0.5% peptona vegetal, 1% fructosa y 10 mM de MgSO₄) con antibióticos (kanamicina 25µg/ml + carbencilina 50µg/ml) y se incubó en las mismas condiciones por 48 h. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugaron las células a 3,000 x g/20 minutos, se descartó el sobrenadante y el paquete celular se re-suspendió en medio de infiltración (10mM MES pH5.5; 2% sacarosa; 0.5g/L Ferty 2 Mega) hasta ajustar la densidad óptica (OD) a 1.0 para cada construcción. Luego se añadió acetociringona (200µM) y se incubó a temperatura ambiente por 2 h. Previo a infiltrar las hojas de *N. benthamiana*, las suspensiones de agrobacteria con la construcción HN se mezclaron 1:5 con la agrobacteria con la construcción p19. La infiltración se realizó con una jeringa de 1ml, sin aguja, colocándola sobre el envés de la hoja y aplicando presión hasta que la solución de agrobacteria se infiltró en la hoja. Se infiltraron 5 hojas por planta con una misma construcción + p19, y se dejaron las plantas en condiciones controladas (22 °C/fotoperiodo 16 h luz) hasta su muestreo. El muestreo se realizó mediante la toma de 5 discos de ~2cm de diámetro (un disco por hoja) del día 3 al 7 post infiltración (dpi). Las muestras se congelaron con nitrógeno líquido y se pulverizaron con ayuda de un mortero, luego se colocaron en viales de ~100mg de muestra por tubo y se mantuvieron a -80 °C hasta su análisis.

5.5.3- Análisis de expresión por Dot blot y Western blot. En orden de evaluar la cinética de expresión de las diferentes proteínas de interés, se desarrollaron métodos de detección basados en el uso de anticuerpos. El primer análisis se hizo mediante Dot blot y Western blot. Para ello, las muestras se resuspendieron con PBS pH7.4 o en buffer de carga SDS (SDS-LB: SDS 4%, Glicerol 30%, betamercapto etanol 10% y azul de bromofenol 1%) y luego se evaluaron por dichos métodos. Dado

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

que se partió de la misma cantidad de peso fresco de hoja (100mg) para cada construcción evaluada, no se determinó la cantidad de proteína total. Para el caso del Dot blot, 3µl de muestra se cargaron en una membrana de nitrocelulosa (Millipore 0.45µm), se dejó secar, y luego se bloqueó con proteína de leche al 5% en PBS por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó la membrana con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-54-tag (Fraunhofer-IME) (1:1,000) o con un anticuerpo policlonal de pollo anti-NDV (Abcam, cat#34402) (1:5,000) por 1 h a temperatura ambiente. Después, se incubó 1 h con anticuerpos secundarios conjugados con fosfatasa alcalina, adecuados para cada anticuerpo primario, cabra anti-ratón (Abcam, cat#6790) (1:5,000) y conejo anti-pollo (Jackson Immuno Research, cat#303-055-003) (1:20,000). Para el revelado de la membrana se usó sustrato de fosfatasa alcalina (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP)/nitro blue tetrazolium (NBT) (Sigma-Aldrich) (1:100) de 10 a 30 minutos. Entre cada incubación se lavó la membrana 3 veces por 5 minutos con PBS-T (Tween 20[®] 0.05%). Para el Western blot, las muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) al 12% a 200V por 45 minutos (Bio-Rad), y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Millipore 0.45µm) por 60 minutos a 100V (Bio-Rad). Una vez transferidas las proteínas a la membrana, esta se incubó de la misma manera que con el Dot blot. Las membranas de Western y Dot se escanearon y se analizaron visualmente, de acuerdo a la intensidad de la banda o punto, respectivamente.

5.5.4- Expresión a mayor escala. Una vez que se determinó la mejor condición de expresión para la proteína HN-tag, mediante los ensayos antes mencionados, se procedió a cultivar las agrobacterias correspondientes a HN-tag, así como la agrobacteria que contenía el gen para la proteína p19. El cultivo se realizó como en los ensayos anteriores, a diferencia de que se aumentó el volumen a 5 litros en total de suspensión bacteriana, a una OD= 0.5 una vez mezclada con la agrobacteria con p19. La infiltración de las hojas de *N. benthamiana* se hizo asistida con vacío en un total de 10 plantas (5-6 semanas de edad) por proteína de interés. Una vez infiltradas, las plantas se colocaron a temperatura controlada hasta por 5 días post infiltración, para luego cosechar las hojas y guardarlas a -80°C hasta el proceso de purificación.

5.5.5- La purificación mediante cromatografía de afinidad con metales inmóviles (IMAC). Se llevó a cabo con el kit de Bio-Rad (Bio-Scale Mini Profinity IMAC) y se usó según las indicaciones del fabricante. Está fundamentado en la afinidad que tienen proteínas con una secuencia de 6 histidinas, como nuestra proteína HN-tag, la cual contiene una secuencia de 6 histidinas (His-tag) en su extremo C-terminal,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

hacia metales inmovilizados en una superficie quelante. El ligando quelante puede ser cargado con metales en transición como Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} o Zn^{2+} . Las concentraciones usadas de imidazol (0, 20 y 40mM; para auxiliar en reducir las interacciones no específicas de otras proteínas) y de NaCl (0.5, 1 y 2M; para reducir efectos de iones no específicos) se diluyeron en buffer PBS pH8. Al momento de la dilución de muestras con PBS y NaCl, estas se incubaron por 30min en hielo y después se centrifugó a $40,000 \times g/20$ minutos, se recuperó el sobrenadante y se descartó el precipitado. Todas las muestras fueron filtradas por un filtro de $0.45\mu\text{m}$ (Millipore Ireland Ltd., Cork, Ireland) antes de cargarse en la columna IMAC. La columna Profinity IMAC se lavó 3 veces con agua destilada y posteriormente se equilibró con 5 volúmenes de acetato de sodio 50mM-NaCl 0.3M pH4. Después se cargaron 5 volúmenes de los diferentes iones metálicos (Cu^{2+} , Ni^{2+} o Zn^{2+}) y luego se lavó con 5 volúmenes de acetato de sodio 50mM-NaCl 0.3M pH4 para eliminar el exceso de iones. Finalmente, se lavó con 10 volúmenes de agua destilada y se equilibró con PBS pH8. Se cargaron y eluyeron las diferentes muestras con las diferentes concentraciones de imidazol y NaCl que se mencionan arriba. Posteriormente las muestras (fracción eluída, flujo y carga) fueron analizadas mediante Western blot, bajo las condiciones mencionadas en el apartado 5.5.3 y las membranas se escanearon y se analizaron visualmente, de acuerdo a la intensidad de la banda. No se realizó ensayo de Bradford para determinar concentración de proteínas, ya que las muestras con imidazol no son compatibles para tal ensayo, y además de que todas las muestras usadas provenían de un homogenizado de tejido vegetal común.

5.6- Virus recombinante NDV cepa P05 (rNDV-P05)

Todos los experimentos fueron llevados a cabo con una versión recombinante del virus de la enfermedad de Newcastle (rNDV-P05), la cual se generó a partir de la cepa velogénica mexicana APMV1/Chicken/México/P05/2005 (Absalon et al 2012; Garzón- Morales et al 2013) y que para nuestro estudio se obtuvo a partir de una vacuna comercial a virus vivo (Investigación Aplicada, S.A. de C.V., Tehuacán, México). Para concentrar y clarificar el virus, un vial de la vacuna fue diluido en 50ml de PBS y se centrifugó a $3,300 \times g/4^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos (Hermle Z383K; Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Germany). Después, el sobrenadante fue esterilizado por filtración ($0.22 \mu\text{m}$; Millipore Ireland Ltd., Cork, Ireland) y el virus fue concentrado por ultracentrifugación a $150,000 \times g/4^{\circ}\text{C}$ por 6h (Beckman Coulter Optima™ max-xp; Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA) sobre una solución 20% de sacarosa estéril. El sobrenadante se desechó y el virus contenido en la pastilla del fondo se resuspendió

en 200µl de PBS y su concentración y actividad se determinó mediante un ensayo de hemaglutinación. Para determinar el pH óptimo de actividad hemaglutinante del virus, soluciones de PBS a diferentes pH (3, 5, 7.4 y 9) fueron preparadas previamente y se usaron para resuspender el virus después del proceso de ultracentrifugación. Para evaluar la temperatura óptima, el virus fue diluido en PBS pH 7.4 y se incubó a 22, 37, 42, 60 y 80 °C durante 2h.

5.7- Ensayo de hemaglutinación

La concentración del virus y la actividad hemaglutinante se determinaron a partir de 25µl de rNDV-P05, incubando diluciones seriales dobles de la muestra en placas de 96 pozos con fondo "U" con 1% de eritrocitos de humano durante 45min a temperatura ambiente. Los resultados fueron expresados como unidades de hemaglutinación (HU), donde una HU representa la dilución más alta del virus donde se observe hemaglutinación es decir, se forme una especie de red entre los eritrocitos evitando la sedimentación de los mismos. Como control positivo y negativo se usaron una vacuna polivalente de influenza (Flu) y PBS, respectivamente. El mismo protocolo se siguió para determinar la actividad hemaglutinante de la proteína HN expresada en plantas de tabaco.

5.8- Identificación de las proteínas virales

Un volumen de 5µl de una muestra del virus concentrado a 10,000 HU/ml fue resuelta por 45-60 minutos a 150V por electroforesis en 10% gel de poliacrilamida-sulfato dodecil de sodio (SDS-PAGE) usando un sistema Mini Protean III (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) y luego se tiñó con colorante Coomassie blue R-250 para su interpretación visual como se ha reportado previamente (Gallagher, 2011). Brevemente, el gel se cubrió con colorante Coomassie blue 0.1%, disuelto en ácido acético 10%, durante 30 minutos en agitación suave (50 rpm). Luego se lavó 3X con agua destilada por 5 minutos y finalmente se dejó 24 h en agua destilada, se escaneó y analizó visualmente.

5.9- Cultivo de líneas celulares

Las células tumorales fueron donadas amablemente por el Dr. Pablo Ortiz (HL-60 y HCC1954; CIBO, Guadalajara), Dra. Susana del Toro (HeLa; CUCS, Guadalajara) y Dr. Daniel Cervantes (A549 y HepG2; UAA, Aguascalientes). Las líneas celulares de humano HeLa, que es un adenocarcinoma de cérvix positivo para virus de papiloma humano serotipo 18, y HepG2, un hepatoblastoma fueron cultivados en medio DMEM (Dubelco's Modified Eagle Medium; Gibco, Grand Island, NY, USA)

suplementado con 1g/l de glucosa, 4mM de L-alanil-glutamina, 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS; Gibco), 50UI/penicilina y 50µg de estreptomicina (Sigma-Aldrich Israel Ltd., Rehovot, Israel); mientras que las líneas celulares de humano HCC1954 (un carcinoma de glándula mamaria), HL-60 (leucemia promielocítica) y A549 (carcinoma de pulmón) fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640; Sigma-Aldrich) suplementado con 2g/l de glucosa, 2mM de L-glutamina, 25mM de HEPES, 10% de FBS (Gibco), 50UI/penicilina y 50µg de estreptomicina (Sigma-Aldrich) a 37°C y 5% de CO₂ en una atmosfera con alta humedad. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) fueron obtenidas de donantes sanos, previo consentimiento por escrito de los donantes, mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Hypaque (Lymphoprep™; Axis- Shield PoC AS, Oslo, Norway) a 832 x g por 20 minutos. Las células contenidas en el anillo de la interfase entre Ficoll y suero fueron colectadas y lavadas tres veces con PBS pH 7.4. La suspensión celular fue liberada de eritrocitos incubándola en 75mM de NH₄Cl por 5 minutos, después las PBMC se lavaron dos veces en PBS y se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado. Para determinar el número de células y la viabilidad celular se determinó con el ensayo de tinción por exclusión con azul tripan 0.1%, tomando 20µl de la solución celular y mezclándola con 60ul de azul tripan, luego se colocaron 10µl de la mezcla en un hemocitometro (Hausser Scientific, Horsham, PA, USA) y contabilizó visualmente en microscopio (Swift Instruments International, Japón) con un aumento 200X. Las células que se tiñeron se contabilizaron como muertas y las que no como vivas. La cantidad de células se determinó con la siguiente formula: número de células= (promedio del conteo de los cuatro cuadrantes)*(10,000)*(factor dilución células:azul tripan)*(volumen suspensión celular). El porcentaje de viabilidad se determinó mediante la relación entre células vivas sobre células totales por cien, y solo se usaron células con un porcentaje de viabilidad >95%.

5.10- Detección de apoptosis

La capacidad del virus para inducir muerte celular programada (apoptosis), sobre las líneas celulares evaluadas, fue determinada siguiendo las instrucciones de un kit comercial (Cell Death Detection ELISA_{PLUS}; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) de inmunodetección ligado a enzima (ELISA) para detección de fragmentos de ADN asociados a histonas (nucleosomas) en el citoplasma, como un indicador de proceso de apoptosis tardío. En breve, las células tumorales y las PBMC fueron sembradas en una placa de 96 pozos, con 1x10⁴ células/pozo en 200µl del medio correspondiente durante 24 y 48h en presencia (10 o 50HU) o ausencia (PBS,

control vehículo) de rNDV-P05. Después del co-cultivo, las células fueron lisadas y centrifugadas a 200 x g/10min (Eppendorf 5415C; Eppendorf, New York, NY, USA), y el sobrenadante (fracción citoplasmática) fue evaluado para la detección de nucleosomas por ELISA. Brevemente, en una placa de 96 pozos, se mezclaron 20µl de muestra con 80µl de una solución con anticuerpos anti-ADN y anti-histona y se incubaron por 2 h a 250 rpm a temperatura ambiente, luego se lavó cada pozo 3 veces por 5 minutos con solución de lavado y finalmente se añadió sustrato para la enzima HRP (peroxidasa de rabano) por 10 minutos y se leyó la placa de ELISA a 405nm en un lector iMark™ (Bio-Rad). Los niveles de apoptosis fueron calculados como el factor de enriquecimiento (EF) de nucleosomas liberado en el citoplasma como sigue: $EF = \frac{OD_{405nm} \text{ del grupo tratado}}{OD_{405nm} \text{ células no tratadas (control PBS)}}$. Las diferencias entre grupos se determinó en base al incremento en los valore de EF.

5.11- Estimulación de PBMC y cuantificación de citocinas

Para la estimulación de PBMC, 1×10^6 células fueron sembradas en placas de 24 pozos con 1ml de medio RPMI-1640 suplementado. Después de 4-6 h de aclimatación, las células fueron co-cultivadas con rNDV-P05 (10 y 20HU) o con un volumen equivalente de PBS (control vehículo) por 24h. Como grupo control positivo, 5µg/ml de lipopolisacárido (LPS; Sigma-Aldrich) fue añadido a la misma cantidad de células y co-cultivado por el mismo tiempo. Después de la estimulación, el sobrenadante sin células de todos los grupos se guardó a -80 °C hasta su utilización. Para medir la concentración de IFN- α , IFN- γ , TNF- α y TRAIL en el sobrenadante de PBMC co-cultivadas como se mencionó, se usaron kit comerciales de ELISA [human IFN- α platinum (eBioscience, Vienna, Austria); human IFN- γ (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA); human TNF- α (Life Technologies, Merelbeke, Belgium); human TRAIL (CD253; Abcam, Cambridge, UK)]. Para IFN- α , se usaron placas de 96 pozos con un anticuerpo anti-IFN- α adsorbido al pozo y se añadieron 20µl de muestra y 80µl de buffer de carga (factor de dilución= 5) por pozo en duplicado, como blanco se usaron 100µl de buffer de carga. Luego se colocaron 50µl de otro anticuerpo anti-IFN- α conjugado con HRP (peroxidasa de rábano), se incubaron por 2 h a temperatura ambiente y agitación 250 rpm. Luego se descartó el contenido y lavó cada pozo con 250µl de buffer de lavado en tres ocasiones por 5 minutos cada una. Finalmente, se añadieron 100µl de sustrato para peroxidasa y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos, se detuvo la reacción con solución de paro y se le leyó a 450nm (655nm como referencia).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Para TNF- α , TRAIL e IFN- γ , se usaron placas de 96 pozos con un anticuerpo específico para cada citocina adsorbido al pozo y se añadieron 50-100 μ l de muestra por pozo por duplicado. Como blanco se usó el mismo volumen pero de buffer de carga. Después, se añadieron 50-100 μ l de un anticuerpo biotinilado específico para cada citocina y se incubó a temperatura ambiente a 250 rpm por 2-3 h. Luego, se descartó el contenido y se lavó 3 veces con 250 μ l de buffer de lavado por 5 minutos cada vez. Posteriormente, se colocaron 50-100 μ l de estreptavidina (tiene gran afinidad por la biotina) conjugada con HRP y se incubó por 30 minutos. Se descartó el contenido y se lavó 3 veces con 250 μ l de buffer de lavado por 5 minutos cada vez. Finalmente, se añadieron 100 μ l de sustrato para peroxidasa y se incubó a temperatura ambiente por 10-30 minutos, se detuvo la reacción con solución de paro y se le leyó a 450nm (655nm como referencia). Cada kit contenía soluciones con concentraciones conocidas de cada citocina, con las cuales se desarrolló una curva estándar siguiendo los mismos procedimientos que para las muestras y los blancos. La concentración de cada muestra se determinó usando la fórmula de la curva y multiplicando por el factor de dilución (cuando aplicó). La curva estándar para cada kit y la formula de la curva se presentan en el anexo II. La absorbancia de cada ensayo de ELISA se midió usando un lector de placas iMark™ (Bio-Rad).

5.12- Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa-mediante transcripción reversa (RT-qPCR)

Las PBMC fueron estimuladas como se describe en la sección anterior, a diferencia de que el co-cultivo con rNDV-P05 o controles positivo/negativo fue por 4 h. El ARN fue aislado de todos los grupos usando un kit comercial Allprep RNA/protein (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, 1×10^6 de PBMC se lisaron con 200 μ l de buffer de lisis por 5 minutos. Luego se cargó la solución lisada en una columna AllPrep y se centrifugó 1 minuto a 16,000 x g. Luego se añadieron 350 μ l de buffer RLT y se centrifugó 1 minuto a 16,000 x g. Después, se colectó la solución que pasó por la columna y se le añadió 350 μ l de etanol 70% y se mezcló vigorosamente. El volumen total (700 μ l) se colocó en una columna RNeasy y se centrifugó 30 segundos a 16,000 x g. Para lavar la columna, se añadió a la columna 700 μ l de buffer RW1 y se centrifugó 30 segundos a 16,000 x g. Nuevamente para dar otro lavado a la columna se añadió 500 μ l de buffer RPE y se centrifugó dos ocasiones por 30 segundos a 16,000 x g. Finalmente, la columna se colocó en un tubo nuevo y estéril de 1.5ml y se añadieron 30 μ l de agua libre de

ARNasa y se centrifugó 1 minuto a 16,000 x g, los 30µl contenían el ARN total puro. Todos los pasos se realizaron a temperatura ambiente.

El ARN fue cuantificado con un NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Inc) usando la relación Abs260/280 y solo las muestras con una relación >1.8 fueron usadas. Cincuenta ng de ARN fue retrotranscrito a ADN complementario (ADNc) usando el kit SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Brevemente, en un volumen de reacción de 20µl se agregaron los siguientes componentes: 1µl oligo (dT) 500µg/ml; 50ng ARN total (el volumen añadido dependía de la concentración de cada muestra); 1µl 10mM dNTP Mix; agua destilada estéril (el volumen dependía para cada muestra). Se mezcló a 65 °C por 5 minutos y se enfrió rápidamente en hielo. Luego se añadieron 4µl 5X First-Strand buffer y 2µl 0.1M DTT, se mezcló gentilmente y se incubó por 2 minutos a 42 °C. Después se añadieron 1µl (200 unidades) de SuperScript™ II RT y se mezcló por pipeteo suave. Finalmente, incubó por 50 minutos a 42 °C por 50 minutos y se inactivó la reacción calentando a 70 °C por 15 minutos. Luego 100ng de ADNc fueron usados como templado para qPCR de acuerdo a las indicaciones del kit SYBR-Green technology (Bio-Rad). Todos los experimentos de qPCR se llevaron a cabo en un sistema 7500 Fast Real Time PCR Applied Biosystems V2.0. Los oligonucleótidos específicos para los genes de *TNF-α* (ID: 25952110c1), *IFN-α* (ID: 11067751a1), *IFN-γ* (ID: 56786137c1), *TRAIL* (ID: 300193031c1) y *β-actin* (ID: 4501885a1) (Tabla 2) fueron elegidos del Primer Bank (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) y se usaron a una concentración final de 120 (*TNF-α* y *IFN-α*) o 200nM (*IFN-γ*, *TRAIL* y *β-actin*). Las condiciones de los ciclos fueron: una desnaturalización inicial a 95 °C por 3 minutos, luego desnaturalización a 95 °C por 10 segundos, alineación a 60 °C (*TNF-α*, *IFN-γ*, *TRAIL* y *β-actin*) y 59 °C (*IFN-α*) por 30 segundos durante 40 ciclos. La expresión del gen de interés se reportó como el cambio del incremento relativo a la señal normalizada al gen de *β-actin* a través del método $\Delta\Delta Cq$ (Schmittgen y Livak, 2008).

Tabla 2. Oligonucleotidos usados para cuantificación de la expresion de diferentes genes de citocinas.

F, forward; R, reverse.

| Gen | #Acceso GenBank | Oligonucleotidos (5'>3') |
|--------------|-----------------|---|
| <i>TNF-α</i> | NM_000594 | F: CCTCTCTCTAATCAGCCCTCTG R: GAGGACCTGGGAGTAGATGAG |
| <i>IFN-α</i> | NM_000605 | F: GCTTGGGATGAGACCCTCCTA R: CCCACCCCCTGTATCACAC |
| <i>IFN-γ</i> | NM_000619 | F: TCGGTAAGTACTGACTTGAATGTCCA |

| | | |
|----------------|--------------|--|
| <i>TRAIL</i> | NM_001190942 | R: TCGCTTCCCTGTTTTAGCTGC F: TGC GTGCTGATCGTGATCTTC R: GCTCGTTGGTAAAGTACACGTA |
| <i>β-actin</i> | NM_0011101 | F: CATGTACGTTGCTATCCAGGC R: CTCCTTAATGTCACGCACGAT |

5.13- Cultivo de la línea celular 4T1 para el modelo de cáncer de mama.

Para el presente protocolo se compró y utilizó la línea celular 4T1 (ATCC® CRL-2539™), la cual deriva de un tumor de mama de ratón Balb/cfC3H y simula al cáncer de mama fase IV en humanos (Pulaski y Ostrand-Rosenberg, 1998). Se sembraron, a partir de viales en congelación, 1×10^6 células en un frasco de 25cm² con 5ml de medio RPMI-1640 modificado con 2 mM L-glutamina, 10 mM HEPES, 1 mM piruvato de sodio, 4,500 mg/l glucosa y 1,500 mg/l sodium bicarbonate (ATCC® 30-2001™) y suplementado con suero fetal bovino inactivado por calor (FBS; Gibco, NY, USA) al 10%, 50 IU/penicilina y 50µg/ml estreptomina (Sigma-Aldrich, Israel). El cultivo se realizó en condiciones de humedad alta a 37 °C en una mezcla de aire con CO₂ 5%. Las células se subcultivaron 2-3 veces por semana y la confluencia se mantuvo no mayor al 70% durante su cultivo. Para la inducción de los tumores en los ratones, las células se cosecharon retirando el medio RPMI-1640 suplementado y lavándolas tres veces con PBS pH7.4 estéril, luego se añadió 1ml de EDTA 0.5mM y se incubaron 5 minutos en las condiciones normales de cultivo mencionadas antes. Después de eso las células desprendidas se resuspendieron en 4ml de medio RPMI-1640 suplementado y se centrifugaron por 10 minutos a 832 x g/4 °C (Hermle Z383K). Enseguida se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla de células en 1ml de PBS pH7.4 estéril y se contabilizaron usando tinción con azul tripan y un hemocitómetro, como se explica en la sección 5.9. Para todos los experimentos se utilizaron células con una viabilidad >95%. Se concentraron las células a 1×10^6 /ml en PBS pH7.4 estéril y se mantuvieron frías por no más de 1 h antes de inyectarse en los animales.

5.14- Inducción del tumor y seguimiento de su crecimiento

Para el modelo se utilizaron ratones (*Mus musculus*; cepa Balb/cAnNHsd) hembras con 7-8 semanas de edad. Todos los experimentos se realizaron bajo la ley interna de cuidado animal de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA). Los ratones sanos (libres de patógenos específicos) se compraron a la empresa Envigo RMS S.A. de C.V. Los ratones se mantuvieron en el bioterio de la UAA bajo

condiciones de luz y temperatura controladas. Tanto el alimento (2018 Teklad Global 18% Protein Rodent Diet, Harlan, Lyon, France) como el agua se proporcionaron *ad libitum*. El material de cama (aserrín) fue esterilizado antes de su utilización. Los animales se pesaron usando una balanza digital (A&D, Co. Japón) y el peso de los animales se registró dos veces por semana durante todo el experimento. La inducción de tumores se llevó a cabo inyectando con una jeringa para insulina (Ultra-Fine, Becton Dickinson, NJ, USA.) 50µl de la solución celular a 1×10^6 /ml (5×10^4 células en total), vía subcutánea en la cuarta glándula mamaria izquierda, justo debajo del pezón. Una vez inducido el tumor, se realizó la medición del tumor primario dos veces por semana registrando el largo y ancho del mismo, usando un Vernier digital (Milomex Ltd. UK). El tamaño del tumor se reportó en mm³ como Volumen Tumor (VT) y se calculó como sigue: $VT = (\text{largo} \times \text{ancho}^2) / 2$. Todos los procedimientos que implicaron la aplicación de inyecciones en los animales se hicieron en condiciones de asepsia y anestesia sistémica.

5.15- Tratamiento *in vivo* con rNDV-P05

El virus se purificó y concentró como se describió a detalle anteriormente. Se aplicaron dos modelos de tratamiento, uno vía intratumoral (IT) y otra vía sistémica (S) a través de la vena de la cola. A cada grupo tratado con el virus se asignó su respectivo grupo control, en el cual se inyectó por la misma vía, pero solo el vehículo en el que se resuspendió el virus, es decir PBS pH7.4 estéril. Para los dos grupos tratados con el virus, IT y S, se inyectaron 1,000HU de rNDV-P05 en 50µl de PBS. La aplicación del tratamiento se realizó un total de tres veces en intervalos de siete días. Al día post inducción del tumor (DPIT) 28 todos los animales fueron sacrificados con una sobredosis de éter. La línea del tiempo de los modelos se describe detalladamente en la figura 10.

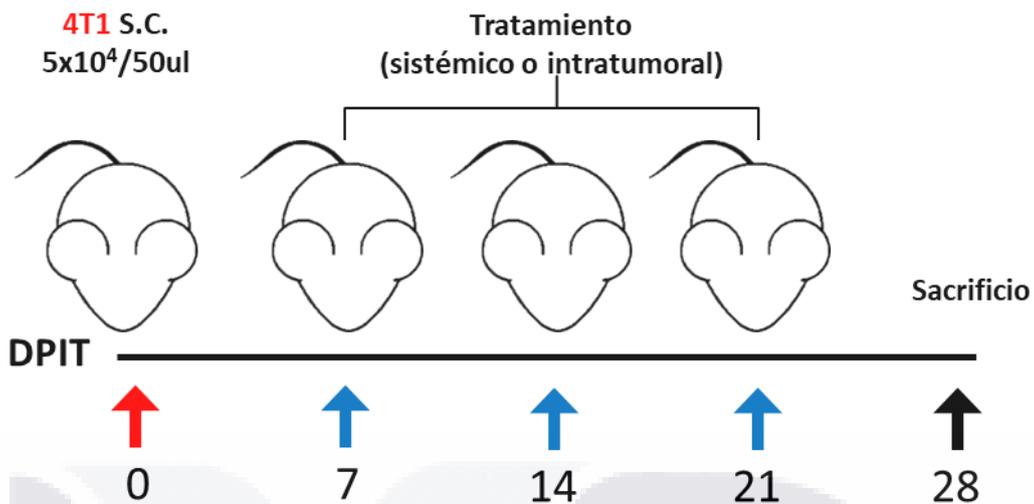


Figura 10. Esquema representativo del modelo tumoral 4T1 en ratón Balb/c.

La inducción del cáncer de mama (DPIT 0) se realizó inyectando vía subcutánea (S.C.) en la cuarta glándula mamaria izquierda 5×10^4 células 4T1 en un volumen de $50 \mu\text{l}$. Los DPIT 7, 14 y 21 se aplicaron los tratamientos, 1,000HU rNDV o control (PBS), tanto para el modelo de administración sistémico como intratumoral. El DPIT 28 se realizó el sacrificio de los animales que habían sobrevivido. Cada grupo se inició con una $n=8$. DPIT= días post inducción de tumor.

5.16- Determinación del peso del tumor, índice del bazo y metástasis en pulmón

Durante el sacrificio de los animales en el DPIT 28, se determinaron diferentes factores que revelan si el tratamiento con el virus tiene efecto sobre el peso del tumor, el índice del bazo y la presencia de metástasis en pulmón. En el caso del tumor, se pesó y se comparó entre grupos control y tratados con rNDV-P05, además se determinó el porcentaje de inhibición tumoral de la siguiente forma: $(\text{media del peso del tumor del grupo control} - \text{media del peso del tumor del grupo tratado}) / \text{media del peso del tumor del grupo control} \times 100$. Los órganos (pulmón y bazo) fueron extirpados en condiciones de asepsia y esterilidad durante el sacrificio y procesados de inmediato. Para calcular el índice del bazo de cada animal, se registró el peso del órgano y se determinó el índice usando la siguiente fórmula: $\text{Índice del bazo (\%)} = \text{peso del bazo} / \text{peso corporal} \times 100$. Finalmente, para comprobar la presencia de metástasis en pulmón se colectó el órgano en PBS estéril y con la ayuda de pinzas y un bisturí se cortó en pequeños pedazos, y se lavaron 3 veces con PBS estéril. Después se colocaron los pedazos del órgano en 5ml de una solución 1mg/ml de Colagenasa IA (Sigma-Aldrich) y se incubaron por 45min a 37°C con agitación suave. Inmediatamente después se añadieron 5ml de PBS para un volumen final de 10ml y se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

pasó el tejido a través de una malla de nylon con un poro de 70 μ m, ejerciendo presión con un pistilo plástico. Esto permitió separar células individuales del tejido previamente digerido con la colagenasa. La suspensión celular posteriormente se centrifugó 10 minutos a 832 x g a temperatura ambiente. El sobrenadante se desechó y la pastilla de células se lavó resuspendiendo en 5ml de PBS estéril. Este procedimiento se repitió dos veces más. Finalmente la pastilla de células se resuspendió en 5ml de medio RPMI-1640 suplementado, como se indicó en la sección de cultivo celular, y se sembró en 2ml del mismo medio en placas de 6 pozos pero con el añadido de 6-tioguanina 60 μ M (Sigma-Aldrich), el cual funciona como agente selectivo ya que es tóxico para células normales, mas no así para la línea tumoral 4T1. Las células se mantuvieron en condiciones de humedad alta a 37 °C en una mezcla de aire con CO₂ 5% durante 7 días, que fue cuando se observó la aparición de colonias clonogénicas metastáticas 4T1. Para cuantificar las colonias de células 4T1, una vez transcurrido el periodo de cultivo, se retiró el medio y se fijaron las células con 1ml de metanol frío durante 10min a 4 °C. Luego, se retiró el metanol y se lavó con 5ml de agua destilada, y se añadieron 0.5ml de colorante cristal violeta 0.1% y se dejó tiñendo por 5min a temperatura ambiente para después retirar el colorante y lavar con 5ml de agua destilada el exceso de colorante. Se dejó secar las placas a temperatura ambiente y se registró el número de colonias clonogénicas metastáticas 4T1 como las colonias que se tornaron violeta para cada grupo.

5.17- Análisis estadístico

Los datos se representan como la media \pm error estándar de al menos tres ensayos independientes. Todos los análisis fueron realizados con el software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Para los ensayos en los que la comparación se hizo entre dos grupos o condiciones, los análisis estadísticos fueron realizados mediante prueba t-Student no pareada de dos colas con un intervalo de confianza del 95%. Cuando se compararon varios grupos o condiciones respecto a un grupo o condición control (rNDV vs control en los ensayos de apoptosis y ensayo de hemaglutinación del rNDV a diferentes valores de pH), se usó una prueba ANOVA de una vía con una prueba Dunnett con un intervalo de confianza del 95%. El peso del tumor, el porcentaje de inhibición del tumor, el índice del bazo y la metástasis en pulmón se compararon mediante la prueba no paramétrica Mann-Whitney de dos colas con un intervalo de confianza del 95%, ya que los datos no presentaban una distribución normal. Un valor $p < 0.05$ fue considerado significativo.

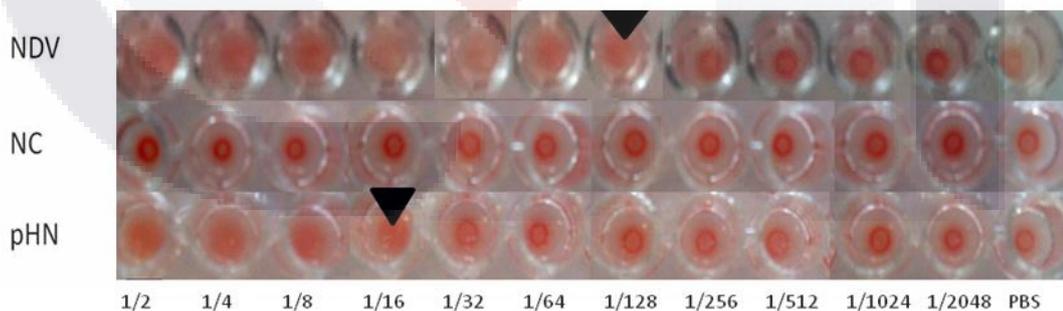
6- RESULTADOS.

6.1- Expresión, purificación y evaluación de la actividad de la proteína HN de hojas de *N. benthamiana*

Se produjo de manera transitoria en hojas de *N. benthamiana* la proteína HN del NDV en un periodo de 6 días. La productividad alcanzada en ese periodo de tiempo fue de $\sim 1\mu\text{g/ml}$ ó $\sim 15\text{mg/kg}$ de peso fresco, de acuerdo al ensayo directo de ELISA. Sin embargo, al momento de purificar la proteína recombinante con el kit ANTI-FLAG® M2 Magnetic Beads solo se logró obtener un rendimiento de $4.5 \pm 0.6\%$.

Por otro lado, con el fin de establecer la actividad biológica de la proteína HN expresada en plantas, se realizó un ensayo de hemaglutinación para establecer las unidades HU de la proteína HN purificada. Se evaluó un extracto crudo de *N. benthamiana* que no expresa la proteína HN (NC), la proteína HN purificada ($\sim 1\mu\text{g}$) y liofilizada (pHN) resuspendida en $25\mu\text{l}$ de PBS y como control positivo una vacuna comercial del virus vivo del NDV (cepa B1; Laboratorios Maver, México). Los resultados se pueden ver en la figura 11A, que indica la HU en el orden de 128 para NDV y 16 para pHN, para el ejemplo que se muestra. Cabe señalar que el ensayo se repitió 3 veces por duplicado ($n= 6$) para cada muestra, mostrando 24 HU en promedio para pHN, y 149 HU en promedio para NDV (figura 11B). La muestra NC no mostró ninguna actividad de hemaglutinación.

A



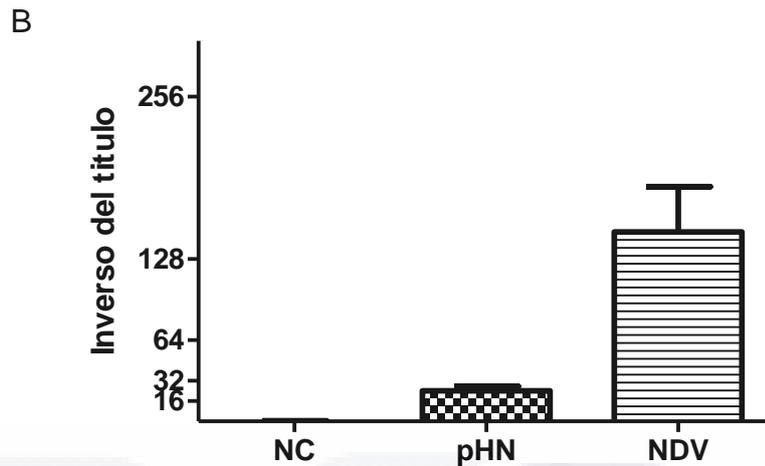


Figura 11. Ensayo de hemaglutinación para la HN producida en hojas cosechadas de tabaco.

A) Se usaron eritrocitos de humano al 1% para analizar la actividad de hemaglutinación de la proteína HN expresada, donde NDV) virus vivo de la enfermedad de Newcastle (cepa B1; Laboratorios Maver, México), como control positivo; NC) extracto (sin HN) de planta de *N. benthamiana* como control negativo; pHN) proteína HN purificada y concentrada por liofilización. Los triángulos negros señalan la máxima dilución en la que se observa hemaglutinación, lo cual corresponde a una unidad de hemaglutinación (1HU). Los números inferiores indican el orden de dilución. B) Gráfico del inverso del título para cada muestra usada en el ensayo de hemaglutinación. El ensayo se realizó de manera independiente 3 veces y por duplicado cada muestra (n= 6) y cada barra representa la media \pm error estandar.

6.2- Precipitación de proteínas

Debido a que durante el proceso de purificación con el kit comercial ANTI-FLAG® M2 Magnetic Beads no se obtuvieron porcentajes altos ($4.5 \pm 0.6\%$) de proteína HN pura, se optó por probar diferentes protocolos para la purificación parcial o total de la proteína recombinante. El método que se empleó dada su simpleza y rapidez fue el de precipitación por metanol/cloroformo. En este se pretendió evaluar la cantidad de proteína HN una vez precipitada y resuspendida en dH_2O o en buffer TBS. También se evaluó si una vez precipitadas las proteínas, al filtrarse ($0.22\mu m$), se perdía significativamente proteína recombinante durante el proceso de filtrado. Los resultados se esquematizan en la figura 12. Se observa que durante el proceso de precipitación se logró obtener $3.8 \pm 0.2\mu g$ cuando se resuspendía el precipitado proteico en dH_2O y, $5.6 \pm 0.1\mu g$ cuando se resuspendía en TBS (de los $11\mu g$ iniciales de proteína HN). Sin embargo al filtrar ambas soluciones, HN+ dH_2O y HN+TBS, se observó una disminución de 11 y 71 veces en la cantidad de proteína HN en la solución, respectivamente (Figura 12). Por otro lado, la obtención por este protocolo fue superior a lo obtenido con el sistema ANTI-FLAG® M2 Magnetic Beads, ya que

con este último apenas se logró recuperar un $4.5 \pm 0.6\%$ de proteína recombinante, en contraste a un $34.4 \pm 1.7\%$ y $51.3 \pm 0.9\%$ (considerando $11\mu\text{g}$ de proteína HN inicial) obtenido al precipitar con metanol/cloroformo y resuspendiendo al final con dH_2O o TBS, respectivamente. Sin embargo, al momento de evaluar la actividad de la proteína HN precipitada, mediante un ensayo de hemaglutinación, los resultados muestran que la actividad aglutinante de la proteína se perdió por completo (Figura 13), indicando que a pesar de que se obtienen niveles más elevados de recuperación, la proteína obtenida no es biológicamente activa, lo cual impide la valoración de la actividad antitumoral e inmunoestimuladora. En la figura 13 se muestra como para la vacuna comercial (NDV B1) se obtuvo un título de 1:128, mientras que para la proteína HN resuspendida tanto en dH_2O como en TBS, no se observó ningún título de hemaglutinación.

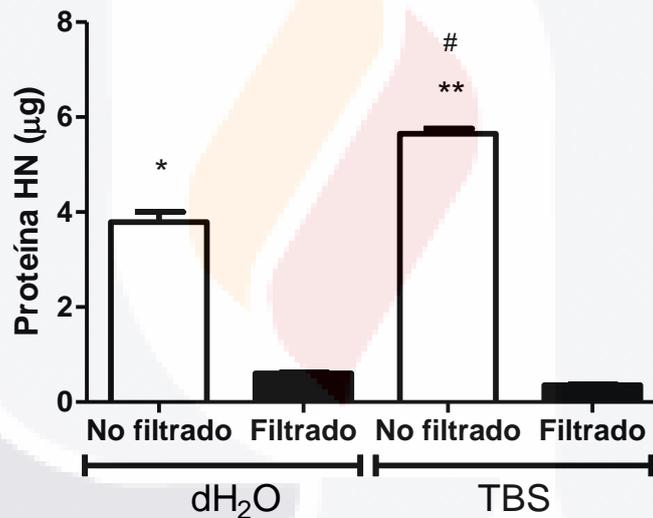


Figura 12. Precipitación de la proteína HN por el método de metanol/cloroformo.

En las muestras precipitadas y resuspendidas, ya sea en dH_2O o en buffer TBS, se cuantificaron sus concentraciones de proteína HN mediante ELISA. Las mismas muestras se filtraron por una membrana de $0.22\mu\text{m}$ y se cuantificaron de la misma manera. Las barras representan la media de tres mediciones independientes \pm error estándar. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ vs filtrado; # $p < 0.01$ vs no filtrado dH_2O .

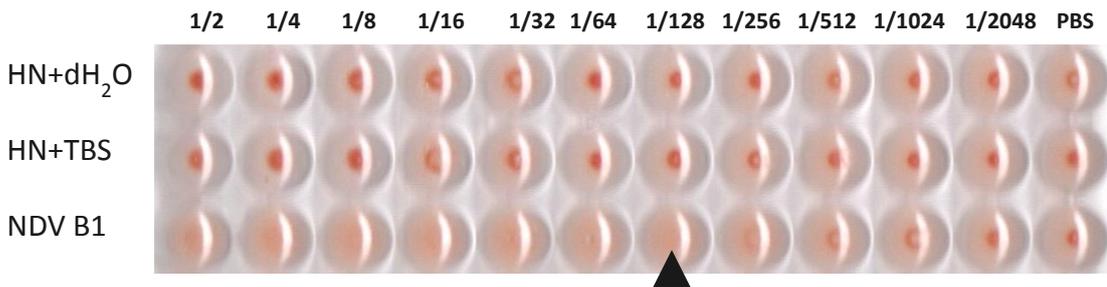


Figura 13. Ensayo de hemaglutinación para la HN purificada por precipitación.

A) Se usaron eritrocitos de humano al 1% para analizar la actividad de hemaglutinación de la proteína HN purificada por precipitación y resuspendida en agua destilada (dH₂O) o TBS. Como control positivo se usó la vacuna comercial del NDV cepa B1 (Laboratorios Maver, México) y como negativo buffer PBS. El triángulo negro señala la máxima dilución en la que se observa hemaglutinación, lo cual corresponde a una unidad de hemaglutinación (1HU). Los números superiores indican el orden de dilución. El ensayo se realizó independientemente dos veces por duplicado para cada muestra.

6.3- Separación microsomal por centrifugación

Debido a que en experimentos anteriores se había observado que durante el proceso de filtrado una gran cantidad de proteína se perdía, se pretendió encontrar la causa de dicho fenómeno. Para ello se manejó la hipótesis de que debido a la presencia de la secuencia de amino ácidos de retención en retículo endoplásmico (KDEL) en el extremo carboxilo terminal de la proteína HN, esta puede estar siendo retenida en fracciones microsomales o interactuando con receptores para dicha secuencia, conformando complejos proteicos que puedan estar siendo capturados durante el proceso de filtrado. Para corroborar dicha hipótesis, se realizó el protocolo de separación de membranas celulares propuesto por Abas y Luschnig (2010), con algunas modificaciones. En dicho protocolo se pueden separar mediante un gradiente de sacarosa tres fracciones de interés: la primera, que corresponde a organelos grandes (ej. núcleo) y que se denominó como “Debris”; la segunda, que contiene proteínas solubles y que se denominó “Sobrenadante” y; la tercera, que contiene principalmente porciones de retículo endoplásmico, denominada “Microsomas”. Una vez separadas las fracciones estas se evaluaron, mediante ELISA, para determinar la concentración de proteína HN en cada una, ya sea provenientes de un extracto vegetal filtrado o sin filtrar. Los resultados obtenidos se muestran gráficamente en la figura 14. Como se puede ver, la concentración de proteína HN, proveniente de un extracto sin filtrar, para cada una de las fracciones es la misma (no significancia estadística, $p=0.0513$). Por otro lado, para las fracciones provenientes de un extracto vegetal filtrado se observó significancia ($p<0.05$) en la fracción Microsomas versus las otras dos, ya que la cantidad de proteína NH detectada en este fracción de

Microsomas fue de prácticamente cero ($-0.3 \pm 8.4 \text{ ng/ml}$) a diferencia a las otras dos que presentaron valores similares, Sobrenadante ($163.3 \pm 34.9 \text{ ng/ml}$) y Debris ($157.3 \pm 52.4 \text{ ng/ml}$). Es de destacarse que para las fracciones Debris y Microsomas, derivadas de un extracto filtrado, la concentración de HN se reduce en un 81.3% ($p < 0.05$) y 100% ($p < 0.01$) respectivamente, con respecto a la fracción sin filtrar, no así en la fracción soluble (Figura 14). Con lo anterior se muestra que, como se especulaba, la proteína recombinante está presente en otras fracciones que no son la soluble y que al filtrarse, la concentración de la misma disminuye considerablemente. Finalmente, para analizar si la cantidad de HN en el extracto de *N. benthamiana* original disminuía importantemente como consecuencia de la filtración, se contabilizó la concentración de HN en el extracto vegetal total antes y después de filtrarlo. Los resultados (Figura 15) mostraron una reducción significativa del 35% ($p < 0.05$) en la concentración de proteína recombinante después de filtrar el extracto.

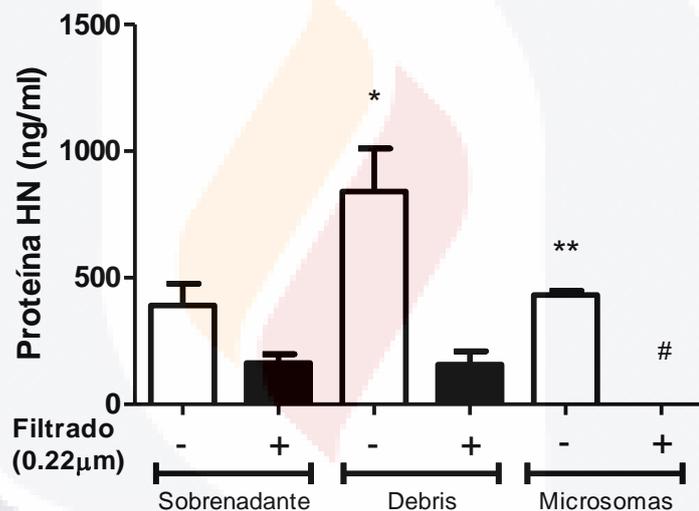


Figura 14. Evaluación de la concentración de la proteína HN en diferentes fracciones celulares.

Se separaron diferentes fracciones celulares (denominadas sobrenadante, Debris y Microsomas) mediante el protocolo de centrifugación en gradiente de sacarosa y se determinó la concentración de HN cada una mediante ELISA, antes y después de la filtración. Las barras representan la media de un total de tres mediciones independientes ($n=3$) \pm error estándar. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs filtrado; # $p < 0.05$ vs otras fracciones.

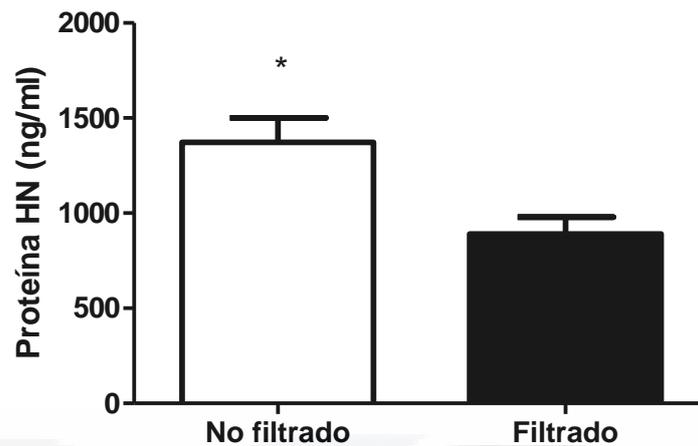


Figura 15. Concentración de la proteína HN en el extracto de *Nicotiana benthamiana*.

Se determinó la concentración de HN, mediante ELISA, en el extracto vegetal antes y después de filtrar (0.22µm). Las barras representan la media ± error estándar de tres mediciones independientes para cada grupo (n=3). *p<0.05 vs filtrado.

6.4- Transformación de *Agrobacterium* para infiltración en plantas completas de *N. benthamiana*

Debido a los malos resultados en la purificación de la proteína HN producida en hojas cosechadas de *N. benthamiana*, se procedió a rediseñar el gen y utilizar estrategias de expresión y purificación distintas, para las cuales se describen a continuación los resultados obtenidos.

Células competentes de *A. tumefaciens* fueron transformadas mediante electroporación con dos diferentes construcciones (Figura 9). Para corroborar que las colonias que crecieron en medio selectivo (YEB + antibióticos) fueron transformadas con cada una de las construcciones, se realizó un check PCR, el cual consistió en amplificar un fragmento de cada construcción. Como se muestra en la figura 16, todas las colonias evaluadas amplificaron el tamaño esperado de banda para cada construcción, además de ser el mismo tamaño de banda que el presente en el control positivo de cada construcción. Los tamaños de banda esperados y obtenidos para la construcción HN nativa y HN-tag fueron 1959bp y 1881bp, respectivamente (Figura 16).

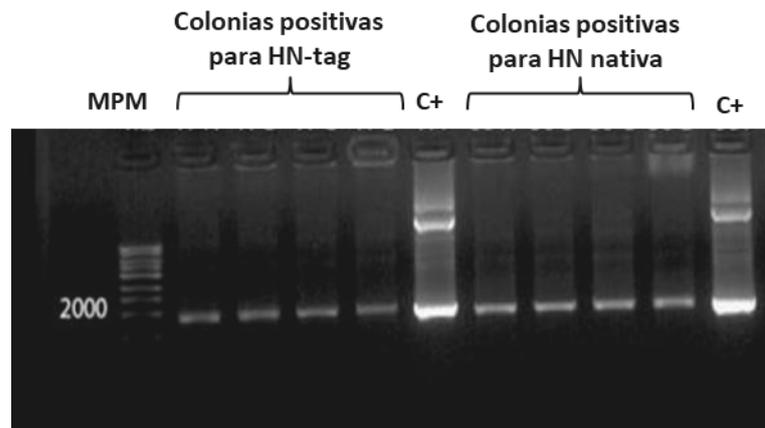


Figura 16. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de colonias positivamente transformadas de *A. tumefaciens*.

Cuatro colonias fueron evaluadas para cada construcción electroporada (HN-tag y HN nativa) por PCR. Se observa la amplificación de una banda de 1881bp y 1959bp para HN-tag y HN nativa, respectivamente, en las colonias de *A. tumefaciens* evaluadas. Las bandas amplificadas en las colonias corresponden al tamaño de banda del control positivo (C+), el cual proviene de DNA plasmídico de cada construcción. MPM= marcador de peso molecular de 1 kilo base.

6.5- Cultivo de *Agrobacterium*, infiltración de *N. benthamiana* y muestreo.

Para la expresión transitoria de las dos construcciones de interés (Figura 9), hojas de *N. benthamiana* fueron infiltradas mediante el uso de una jeringa. Se muestrearon a los dpi 3 al 7, en orden de determinar la cinética de expresión de las proteínas de interés. Se pudo observar que durante todos los días de muestreo las plantas permanecieron visiblemente sanas, sin la presencia de manchas necróticas u otra señal de daño en el tejido, aparte de las ocasionadas durante el proceso de infiltración (Figura 17).



Figura 17. Imágenes de plantas de *N. benthamiana* infiltradas y analizadas en diferentes días post infiltración (dpi).

Se observa por la coloración, que las hojas infiltradas están sanas incluso al dpi 7.

6.6- Análisis de expresión de HN nativa y HN-tag en *N. benthamiana* infiltradas.

En orden de evaluar la expresión de las proteínas de interés, se desarrollaron métodos analíticos basados en el uso de anticuerpos. Para ello primero se buscó determinar si las proteínas se expresaban y de determinar si existía alguna diferencia en la expresión a lo largo de los dpi. Para ello se realizó un Dot blot que se reveló con un anticuerpos anti-NDV para detectar las diferentes proteínas de interés (Figura 18 A y B). Como se observa, la detección de las diferentes proteínas con el suero anti-NDV solo se pudo lograr diluyendo las muestras en condiciones nativas (PBS), siendo más notables la proteína HN-tag (Figura 18A). Cuando se añadió 1%SDS a las muestras, la detección se redujo notablemente y por completo al disolver las muestras en buffer de carga (2xSDS-LB), el cual presentaba condiciones reductoras por sus componentes (beta-mercaptoetanol). Debido a estos resultados, se optó por determinar la cinética de expresión a lo largo de diferentes dpi solamente en condiciones nativas. Se observa que la expresión fue constante a lo largo de los diferentes dpi para las muestras con HN tag. Sin embargo, las muestras de HN nativa mostraron una señal muy débil, casi igual a la del control negativo (rfp). Por otro lado, cuando las muestras se probaron con un anticuerpo anti-54 tag (Figura 18C), se observó una señal más intensa en HN-tag comparada con la obtenida usando un suero anti-NDV (Figura 18B), lo que indica una menor especificidad del suero policlonal por la proteína HN expresada. Con respecto a las demás muestras (rfp, NDV y HN nativa) no se observó ninguna señal como era de esperarse, ya que estas no tienen la secuencia 54 tag (Figura 18C). Tomando esto en cuenta se procedió a espesar a gran escala solamente la proteína HN-tag y a su posterior purificación.

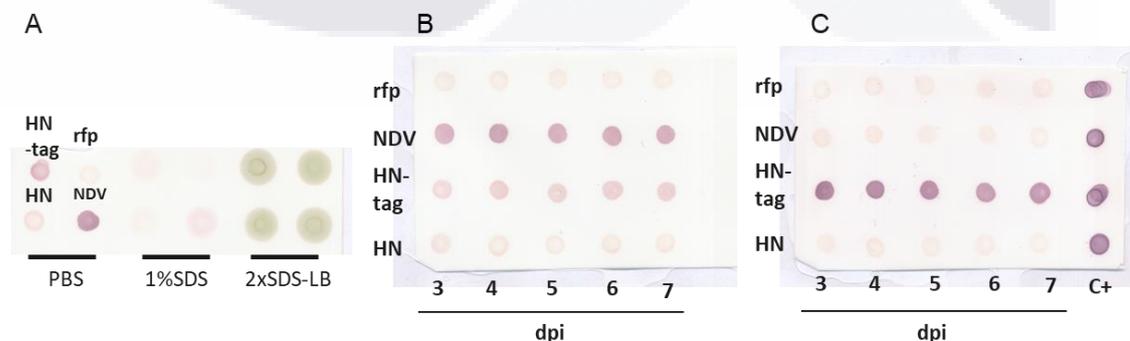


Figura 18. Análisis de expresión y reactividad de las proteínas de interés mediante Dot blot.

A) Detección al dpi 5 de las diferentes proteínas disueltas en condiciones nativas (PBS), no reductoras (1%SDS) y reductoras (2xSDS-LB). B) y C) Muestras diluidas en PBS. Se usó un

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

suero policlonal anti-NDV para detectar las muestras de A y B; y un anticuerpo monoclonal anti-54 tag para las muestras de C. Cada punto corresponde a 3µl de muestra cargados en la membrana de nitrocelulosa. rfp= proteína rojo fluorescente y control negativo; NDV= virus de la enfermedad de Newcastle (control positivo suero anti-NDV); dpi= días post infiltración; C+= control positivo para 54 tag.

6.7- Purificación de HN-tag por IMAC.

Debido a que la proteína HN-tag contiene una secuencia de 6 Histidinas (His-tag) en el extremo C-terminal, se tomó ventaja de ello para determinar la mejor condición para su purificación mediante cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados (IMAC). Dentro de las variables que se probaron fue el tipo de metal (Ni, Zn y Cu), concentración de imidazol en el buffer de captura y de lavado (0, 20 o 40mM) y la concentración de NaCl en el buffer de extracción de la muestra (PBS + 0.5, 1 o 2M). Para determinar la eficacia de las variables se evaluó mediante Western blot la fracción eluida, es decir, la fracción que contiene la proteína pura, así como la fracción del extracto antes (Carga) y después (Flujo) de pasar por la columna cromatográfica. Como se puede observar en la figura 19 (Ni), cuando se usa níquel como metal de captura e imidazol en el buffer de captura y lavado, existe una correlación positiva entre la concentración de la proteína HN-tag (flecha negra) en la fracción eluida y la concentración de imidazol, siendo lo contrario para la concentración de NaCl. Por otro lado, en el flujo no se observa la banda correspondiente al monómero de la proteína HN-tag (flecha negra, 70kDa), mientras que para las muestras con NaCl, se observa ligeramente la presencia de una banda de 70kDa. Para las muestras purificadas con zinc y cobre (Figura 19 Zn y Cu, respectivamente) se observa un patrón similar al del níquel, sin embargo la intensidad de las bandas es menor, lo que parece indicar que la afinidad por el níquel es mayor durante la purificación. Y como era de esperarse, la muestra de carga (antes de purificar) sin NaCl (0), con 0.5M y con 1M presentan una banda correspondiente al peso esperado de la proteína HN-tag.

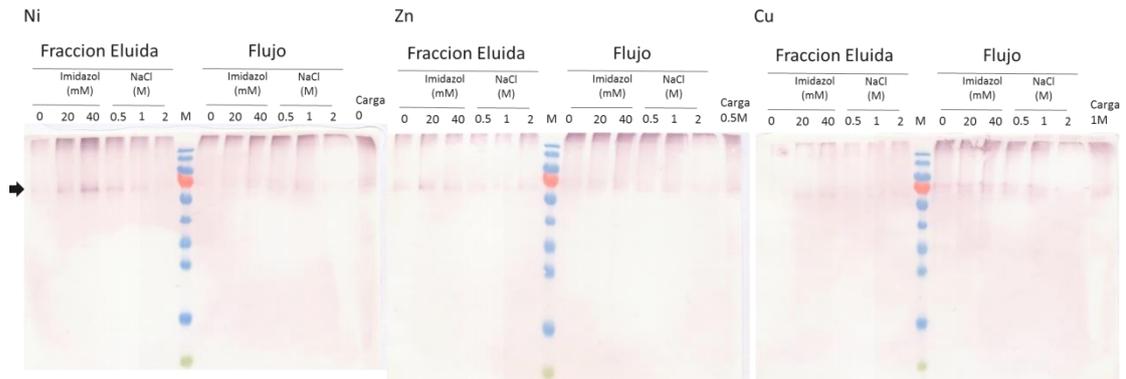


Figura 19. Western blot de las fracciones de la purificación por IMAC de la proteína HN-tag.

Se analizaron las diferentes fracciones (carga, flujo y eluida) obtenidas durante la purificación con diferentes concentraciones de imidazol en el buffer de captura y de lavado (0, 20 y 40mM), así como diferentes concentraciones de NaCl (0.5, 1 y 2M) en el buffer de extracción PBS. Como anticuerpo primario se usó anti-54tag. Ni= níquel; Zn= zinc; Cu= cobre; M= marcador de peso molecular.

Una vez determinada la mejor condición para la purificación de la proteína HN-tag, se realizó una producción a gran escala y se obtuvieron 50g de tejido vegetal. Luego se purificó la proteína conforme a las condiciones determinadas anteriormente con el uso de IMAC. Se determinó la pureza de todas las fracciones durante la purificación mediante SDS-PAGE y la presencia de la proteína HN-tag se evaluó mediante Western blot específico para el 54-tag (Figura 20).

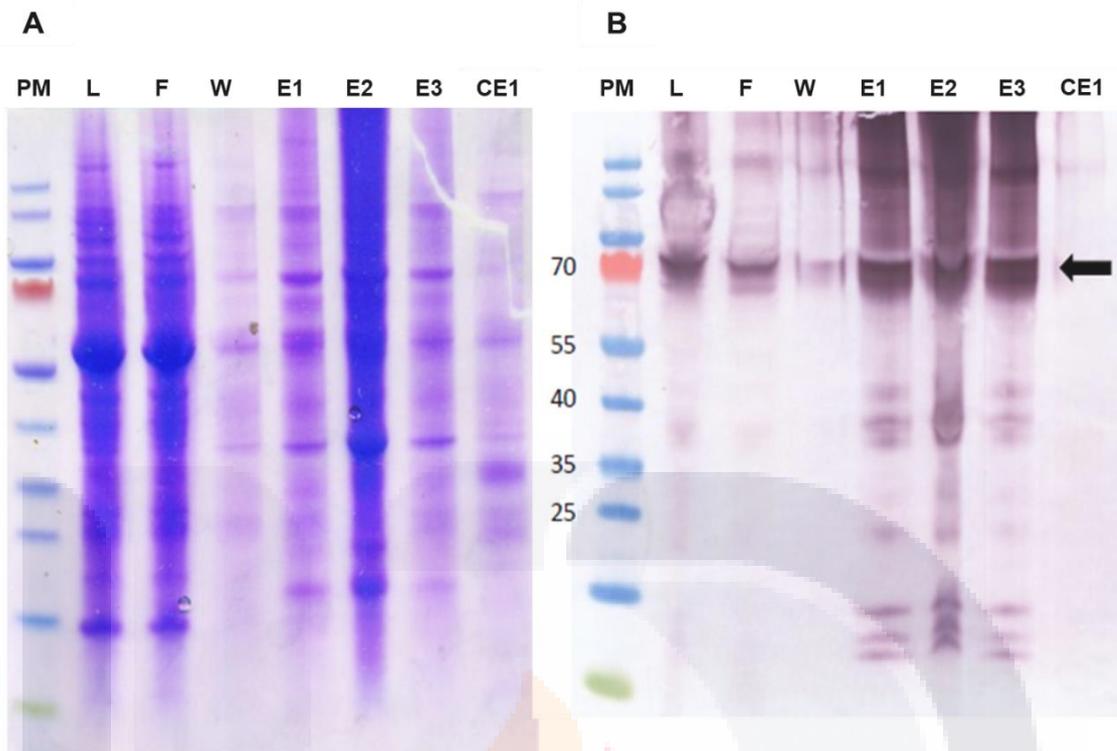


Figura 20. Análisis mediante SDS-PAGE y Western blot de la proteína HN-tag purificada por IMAC.

A) Gel SDS-PAGE teñido con Coomassie de las diferentes fracciones obtenidas durante la purificación. B) Identificación de la proteína HN-tag mediante Western blot con un anticuerpo específico para el 54-tag. PM= marcador de peso molecular en kDa; L= extracto de carga en IMAC; F= fracción de flujo no capturada en IMAC; W= fracción de lavado; E1-3= fracciones eluidas donde se espera mayor presencia de HN-tag; CE1= fracción eluida control con un extracto de *N. benthamiana* sin HN-tag. La flecha indica el peso al cual se espera observar la proteína HN-tag (70kDa).

En la figura 20 A se muestra el gel SDS-PAGE teñido con Coomassie de la cantidad total de proteínas presentes en las diferentes muestras generadas a lo largo de la purificación. Se puede observar que entre la cantidad de proteína total cargada (L) y la presente en la fracción de flujo que no se unió a IMAC (F) no hubo mucha diferencia, indicando que solo la HN-tag se unió a IMAC. Las fracciones eluidas 1 y 3 (E1 y E3) mostraron una cantidad de proteína total menor a la elución 2 (E2) y a la L y F, desmostrando cierta pureza de las fracciones eluidas. En la figura 20 B se muestra la membrana de Western blot, y se observó que la intensidad de la L y la fracción F fueron muy semejantes, lo que indica que no se unió el total de la proteína HN-tag producida. Sin embargo en las fracciones de elución, se observó una mayor intensidad en la banda esperada (70kDa), lo que indica que la purificación de la proteína si fue posible. Aunque, se observó una gran cantidad de la proteína HN-tag en pesos superiores a 70kDa (posiblemente formando polímeros) y también fracciones de la misma en pesos menores a 70, aunque en mucho menor grado.

6.8- Actividad hemaglutinante de la proteína HN-tag.

Una vez que se logró producir y purificar la proteína HN-tag se procedió a determinar si poseía actividad hemaglutinante, por lo que se realizaron ensayos de hemaglutinación con muestras purificadas y extractos con HN-tag. Se determinó que a pesar de que se logró producir y purificar la proteína HN-tag esta no mostró actividad hemaglutinante frente a eritrocitos (Figura 21). De la misma forma los extractos con HN-tag tampoco mostraron ninguna actividad hemaglutinante. Para el control positivo (HA-control+), el cual corresponde a una hemaglutinina recombinante de influenza, se observó un título de 1:32.

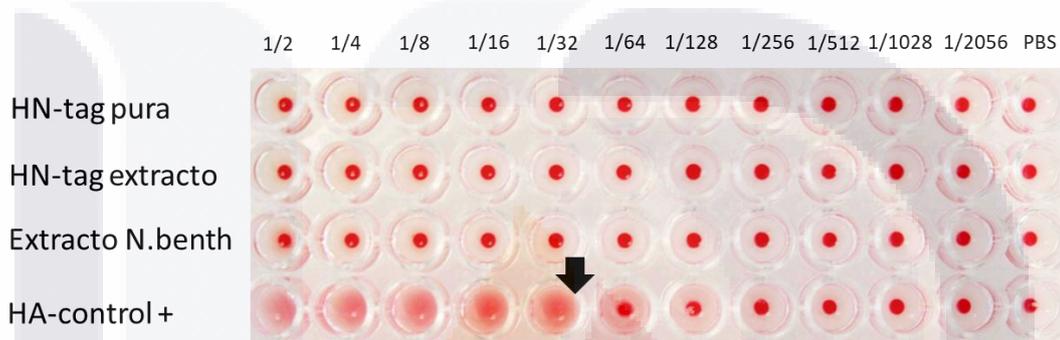


Figura 21. Ensayo de hemaglutinación para la proteína HN-tag.

Se usaron eritrocitos de humano al 1% para analizar la actividad de hemaglutinación de la proteína HN-tag pura Y un extracto de HN-tag. Como control positivo (HA-control+), se utilizó una hemaglutinina recombinante de influenza. Como control negativo se usó bufer PBS y un extracto de *N. benthamiana* sin HN (Extracto N.benth). La flecha señala la máxima dilución en la que se observa hemaglutinación, lo cual corresponde a una unidad de hemaglutinación (1HU). Los números superiores indican el orden de dilución. El ensayo se realizó independientemente dos veces por duplicado para cada muestra.

6.9- Caracterización de rNDV-P05

Las proteínas de muestras de rNDV-P05 concentradas por ultracentrifugación fueron resueltas e identificadas mediante electroforesis SDS-PAGE (Figura 22A). Las cinco bandas mayores corresponden a los pesos moleculares de las proteínas estructurales del NDV, las cuales incluyen a la proteína HN (75kDa como monómero y 150kDa como dímero), F (65kDa), NP (50-55kDa) y M (40kDa). La actividad biológica de rNDV-P05 se determinó mediante el ensayo de hemaglutinación (Figura 22B) y 1HU de una muestra de rNDV-P05 fue titulada a 1:128. Adicionalmente, en orden de encontrar la mejor condición para el manejo de rNDV, diferentes valores de pH y temperaturas fueron aplicadas al virus después de su concentración y posteriormente se desarrollaron ensayos de hemaglutinación. Los resultados a detalle se resumen en la figura 23 y tabla 3. Los títulos de hemaglutinación de rNDV cambiaron de acuerdo a los valores de pH, con el menor valor observado a un pH 3 (1:32; $p < 0.001$) y

reduciéndose el título a pH 5 y pH 9 (1:64; $p < 0.001$) comparado al título de hemaglutinación del virus en pH 7.4 (1:128). Por otro lado, las temperaturas mayores a 42°C inhabilitaron por completo la actividad hemaglutinante del virus.

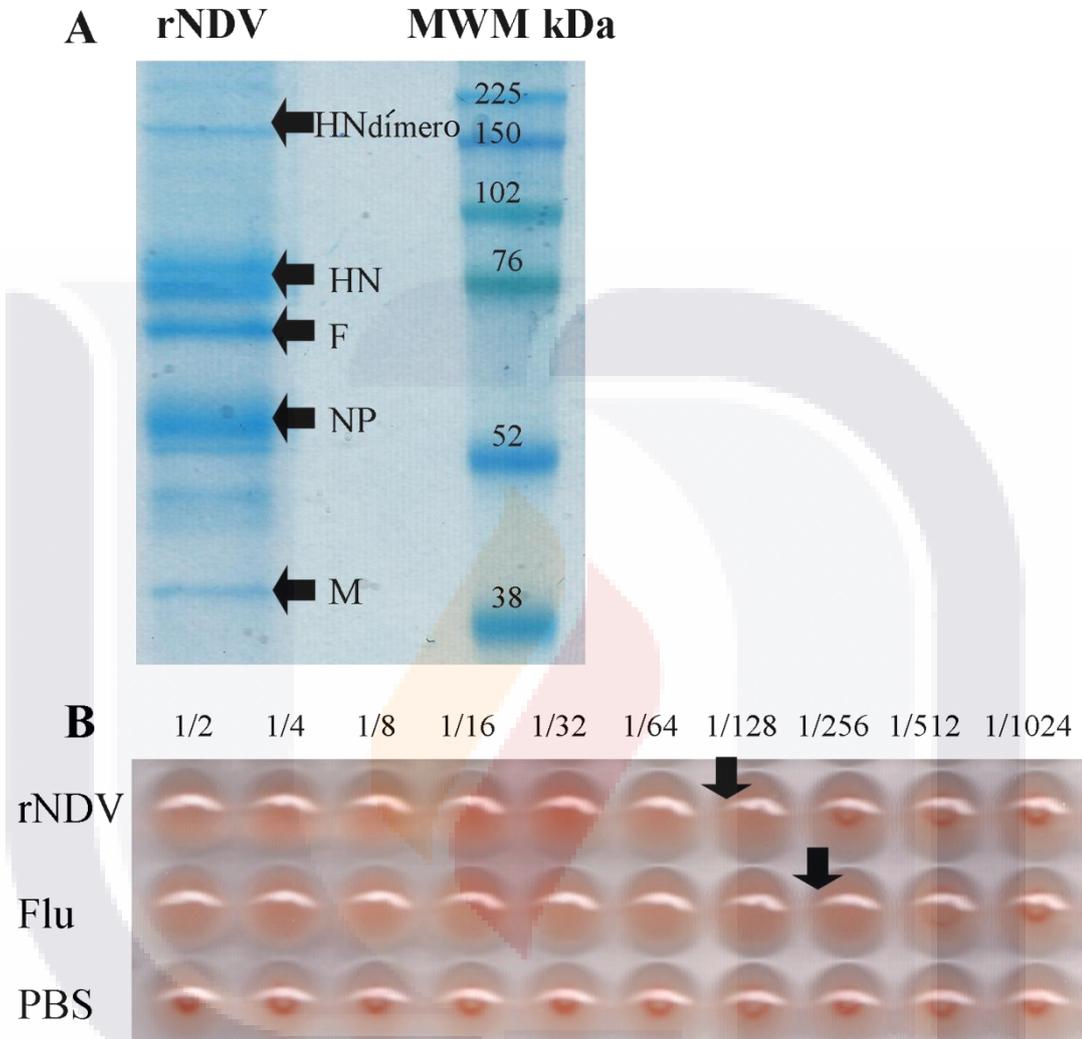


Figura 22. Caracterización de las proteínas y actividad hemaglutinante de rNDV-P05.

A) Electroforesis por SDS-PAGE del virus concentrado después del proceso de ultracentrifugación. Las flechas indican el peso molecular para las proteínas estructurales del virus: HN como monómero o dímero, F, NP, M. B) Ensayo de hemaglutinación representativo para la determinación de la actividad y concentración de viales de rNDV-P05. Las flechas indican el título más alto donde se observa hemaglutinación. El PBS y una vacuna de influenza (Flu) se usaron como control negativo y positivo, respectivamente. HN, Hemaglutinin-neuraminidasa; F, proteína de fusión; M, proteína de matriz; NP; proteína de la nucleocapside; MWM, marcador de peso molecular; kDa, kilo Daltons; rNDV, vacuna recombinante atenuada de NDV cepa P05.

Tabla 3. Caracterización fisicoquímica de la actividad hemaglutinante de rNDV-P05 mediante ensayo de hemaglutinación.

* $p < 0.001$ vs pH 7.4

| Condición | pH | | | | Temperatura (°C) | | | | |
|--------------------|-----|-----|-----|-----|------------------|-----|-----|----|----|
| | 3 | 5 | 7.4 | 9 | 22 | 37 | 42 | 60 | 80 |
| Inverso del título | 32* | 64* | 128 | 64* | 128 | 128 | 128 | 0 | 0 |

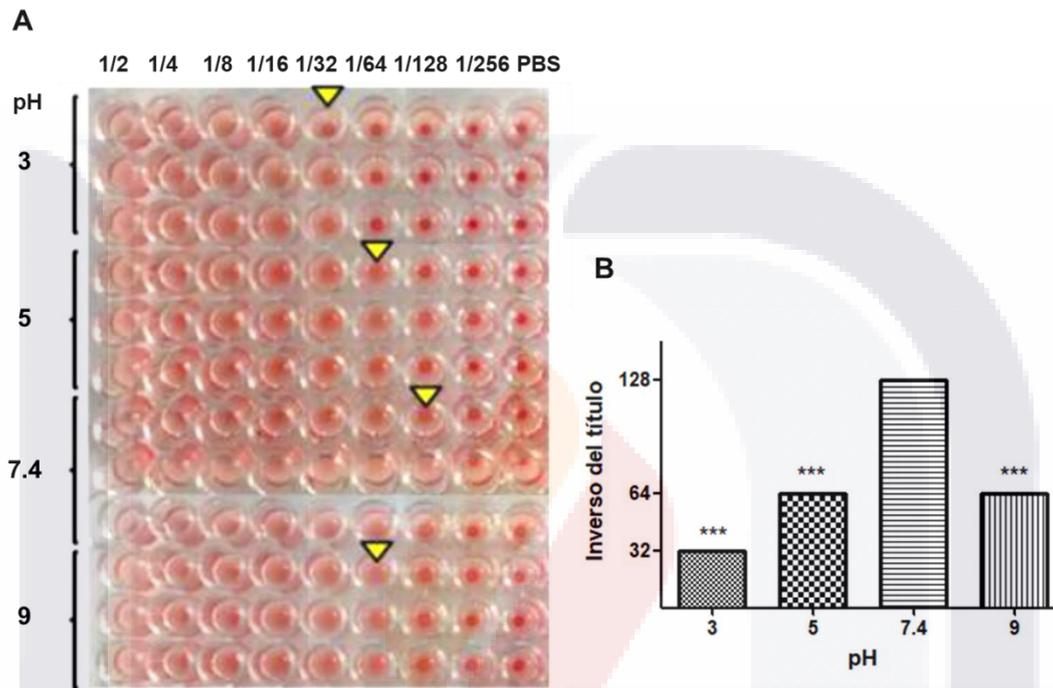


Figura 23. Efecto del pH sobre la actividad hemaglutinante del NDV.

A) Imagen representativa de un ensayo de hemaglutinación. B) Los datos representan la media \pm error estandar del inverso del título obtenido de dos ensayos de hemaglutinación independientes por triplicado. *** $p < 0.0001$ vs pH 7.4

6.10- El rNDV-P05 induce apoptosis en células HeLa, HCC1954, HL-60 y HepG2, pero no en células A549 y PBMC.

La actividad antitumoral de rNDV-P05 se determinó como la capacidad del virus de desencadenar un proceso de muerte celular programada o apoptosis en diferentes líneas celulares. Cuatro de las cinco líneas tumorales mostraron sensibilidad al rNDV, de una manera dosis y tiempo dependiente (Figura 24). Para las células HeLa, los valores de EF se incrementaron cuando las células fueron incubadas con 10 o 50HU de rNDV en ambos tiempos de incubación, comparado a las células control ($p < 0.001$ para 10HU/48 h, $p < 0.001$ para 50HU/24 y 48 h; Figura 24A). El efecto proapoptótico de 50HU del virus fue significativamente mayor que el de 10HU a las 48 h

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

($p < 0.01$). El periodo de incubación fue relevante en la actividad antitumoral, ya que a las 48h se observó un mayor efecto que a las 24 h, con ambas concentraciones del virus, 10HU ($p < 0.001$) y 50HU ($p < 0.05$). En el caso de la línea HCC1954, el EF aumentó significativamente a las 24 h (10HU $p < 0.05$ y 50HU $p < 0.001$) y a las 48h ($p < 0.001$) con ambas concentraciones del virus (Figura 24B). Este efecto pro-apoptótico fue mayor cuando las células se incubaron con la dosis mayor del virus y en el tiempo mayor ($p < 0.001$). Cuando se evaluó la línea HL-60, los valores de EF aumentaron cuando las células fueron tratadas con 10 o 50HU del virus por 24 y 48h (10HU a 24 h, $p < 0.01$ y a 48 h, $p < 0.05$; 50HU a 24 h, $p < 0.001$ y a 48 h, $p < 0.01$; Figura 24C) y el efecto antitumoral de 50HU fue mayor que con 10HU a las 24 h ($p < 0.05$). Sorprendentemente, se observó un decremento en los valores de EF comparando 10HU a las 24 h vs 48 h ($p < 0.05$) y 50HU a las 24 h vs 48 h ($p < 0.01$). Para las células HepG2, los tratamientos con el virus indujeron un aumento en los valores de EF al compararse con el grupo control (10HU a 24 h, $p < 0.01$ y a 48 h, $p < 0.001$; 50HU a 24 h y 48 h, $p < 0.001$; Figura 24D). El efecto antineoplásico del rNDV-P05 sobre HepG2 fue mayor usando 50HU, independientemente del tiempo de co-cultivo ($p < 0.05$), pero solo la exposición a 10HU por 48 h indujo un incremento ($p < 0.001$) en el efecto pro-apoptótico en relación a las 24 h. Finalmente, las células A549 y PBMC no mostraron susceptibilidad al efecto pro-apoptótico del virus en ninguna de las condiciones de dosis y tiempo evaluadas (Figura 24E y F). Tomando en conjunto los resultados, se observó que el efecto pro-apoptótico de rNDV-P05 y su magnitud es específico para cada línea tumoral, ya que no hubo efecto evidente sobre la línea tumoral de pulmón A549. Además, las PBMC aisladas de donantes sanos, se mostraron insensibles al efecto pro-apoptótico del virus, lo cual resulta de gran importancia para el estudio posterior de inmunoestimulación de las PBMC con el virus.

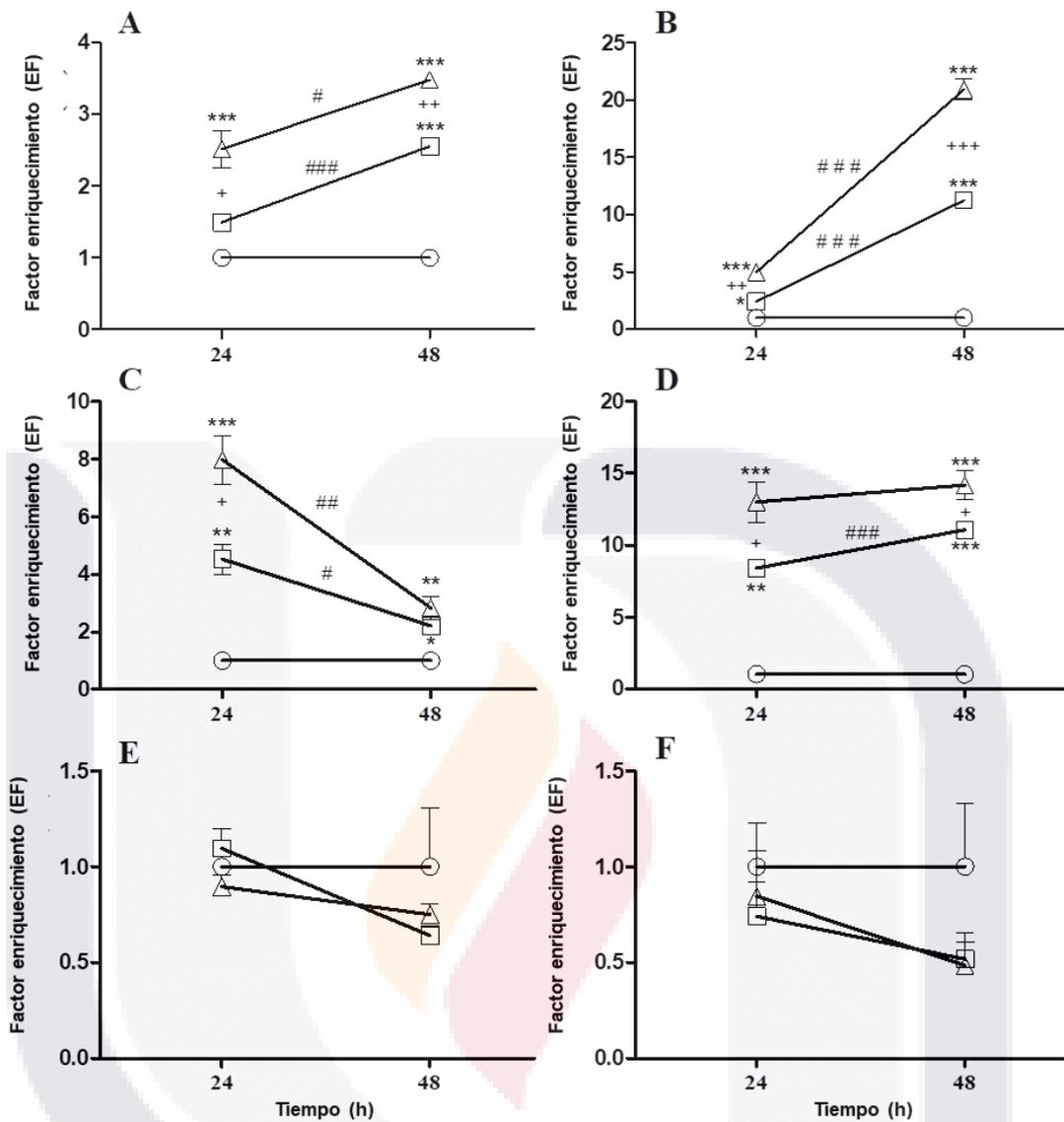


Figura 24. Evaluación de la actividad antitumoral del NDV sobre las líneas tumorales.

HeLa (A), HCC1954 (B), HL-60 (C), HepG2 (D) y A549 (E), y células normales PBMC (F). Análisis estadístico en función del factor de enriquecimiento (EF) de nucleosomas en citosol tras su incubación con 10HU (□), 50HU (Δ) del virus contra un control negativo (no virus, O) a las 24 y 48 h. HCC1954, * $p < 0.05$ vs control; *** $p < 0.001$ vs control; ++ $p < 0.01$ entre HU's a 24 h; +++ $p < 0.001$ entre HU's a 48 h; ### $p < 0.001$ mismo HU, 24 vs 48 h. HeLa, *** $p < 0.001$ vs control; + $p < 0.05$ entre HU's a 24 h; ++ $p < 0.01$ entre HU's a 48 h; # $p < 0.05$ mismo HU, 24 vs 48 h; ### $p < 0.001$ mismo HU, 24 vs 48 h. HepG2, ** $p < 0.01$ vs control; *** $p < 0.001$ vs control; + $p < 0.05$ entre HU's a 24 o 48 h; ### $p < 0.001$ misma HU, 24 vs 48 h. HL-60, * $p < 0.05$ vs control; ** $p < 0.01$ vs control; *** $p < 0.001$ vs control; + $p < 0.05$ entre HU's a 24 h; # $p < 0.05$ misma HU, 24 vs 48 h; ## $p < 0.01$ misma HU, 24 vs 48 h. A549 y PBMC no mostraron diferencia significativa entre los grupos tratados en ambos tiempos.

6.11- El rNDV-P05 induce liberación de citocinas por PBMC.

Para investigar si rNDV-P05 puede estimular células del sistema inmune, PBMC aisladas de cinco donantes sanos fueron incubadas con 10 y 20HU del virus y varias citocinas fueron cuantificadas en el sobrenadante. Veinte cuatro horas después de estimular con las diferentes concentraciones de rNDV se indujo la secreción de altas cantidades de TNF- α , IFN- α , TRAIL e IFN- γ de PBMC, como se muestra en la figura 25. Para TNF- α , ambas dosis del virus incrementaron significativamente la secreción de esta citocina comparado con el control basal ($p < 0.001$; Figura 25A), y fue similar a la mitad de la concentración alcanzada con el control positivo (LPS). Además, la respuesta en cada uno de los cinco donantes fue muy similar. Como se muestra en la figura 25B, una baja cantidad de TRAIL fue secretada por los grupos de control basal y de LPS, mientras que la estimulación con 10 o 20HU de rNDV-P05 aumentó considerablemente la secreción de TRAIL por PBMC, comparado al control basal ($p < 0.01$). Interesantemente, las células de los donantes cuatro y cinco registraron valores de TRAIL similares a los del grupo sin estímulo. En relación al IFN- α (Figura 25C), en el grupo control y el estimulado con LPS no hubo niveles detectables de la citocina, y por otro lado ambas dosis usadas del virus indujeron una concentración considerable de IFN- α en el medio ($p < 0.05$ con 10HU; $p < 0.01$ con 50HU). Es de señalarse que las células de los donantes cuatro y cinco mostraron la menor respuesta al estímulo con rNDV. Finalmente, ambas dosis del virus y el grupo con LPS incrementaron significativamente la concentración de IFN- γ comparado al grupo sin estímulo ($p < 0.05$ con LPS; $p < 0.01$ con 50HU; $p < 0.001$ con 10HU; Figura 25D). Para esta citocina en particular, las células del donante cuatro registraron la menor concentración en respuesta a la estimulación con rNDV-P05.

6.12- Respuesta temprana de citocinas a nivel de ARNm inducido por rNDV-P05 en PBMC.

Como se señaló anteriormente, la estimulación de PBMC con rNDV fue evaluado en una etapa tardía (24 h) mediante ELISA para determinar la concentración de las citocinas en el medio de cultivo. Adicionalmente, una respuesta temprana fue determinada por PCR tiempo real a las 4h después de la estimulación (Figura 26). Las PBMC tratadas con 20HU del virus incrementaron 3.06 veces la expresión de TNF- α ($p < 0.01$; Figura 26A), 8.64 veces la de TRAIL ($p < 0.01$; Figura 26B), 10.8 veces la de IFN- α ($p < 0.01$; Figura 26C) y 11.41 veces la de IFN- γ ($p < 0.05$; Figura 26D), comparado con PBMC sin estímulo. Al mismo tiempo, PBMC tratadas con LPS solo

incrementaron la expresión de TRAIL en comparación al grupo control ($p < 0.05$; Figura 26B).

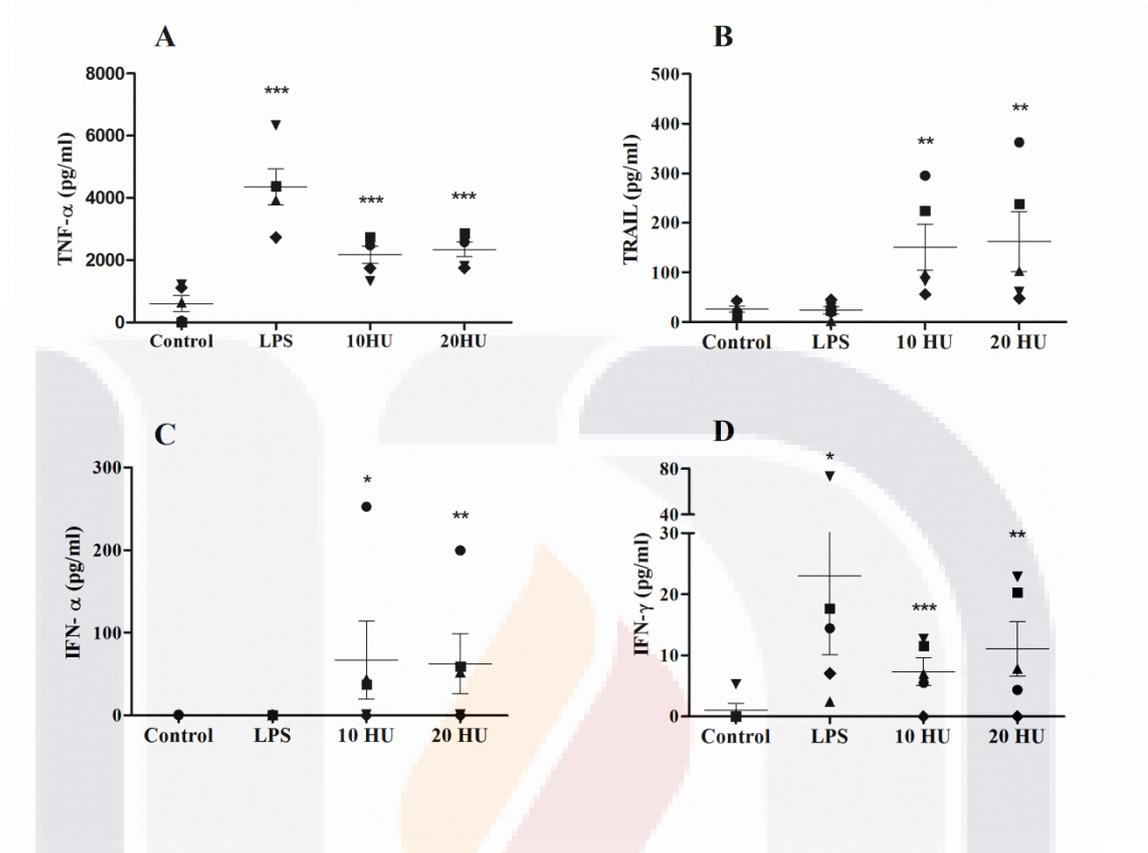


Figura 25. Actividad inmunoestimuladora de rNDV-P05 sobre PBMC evaluadas por ELISA.

(A) Secreción de TNF- α , (B) TRAIL, (C) IFN- α y (D) IFN- γ por PBMC después de 24 h de co-cultivo con rNDV-P05 (10 y 20HU/ml) o LPS (5 μ g/ml). Las células del grupo control se incubaron con PBS. Los resultados se presentan como la media \pm error estándar. Las citocinas se determinaron por duplicado en PBMC aisladas de cinco donantes sanos: donante 1 (●); 2 (■); 3 (▲); 4 (◆); y 5 (▼). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ en comparación al control. rNDV-P05, cepa de NDV atenuada recombinante P05; PBMC, células mononucleares de sangre periférica; ELISA, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas; TNF- α , factor de necrosis tumoral- α ; TRAIL, ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral; IFN, interferón; LPS, lipopolisacárido; PBS, solución salina tamponada con fosfato; HU, unidades de hemaglutinación.

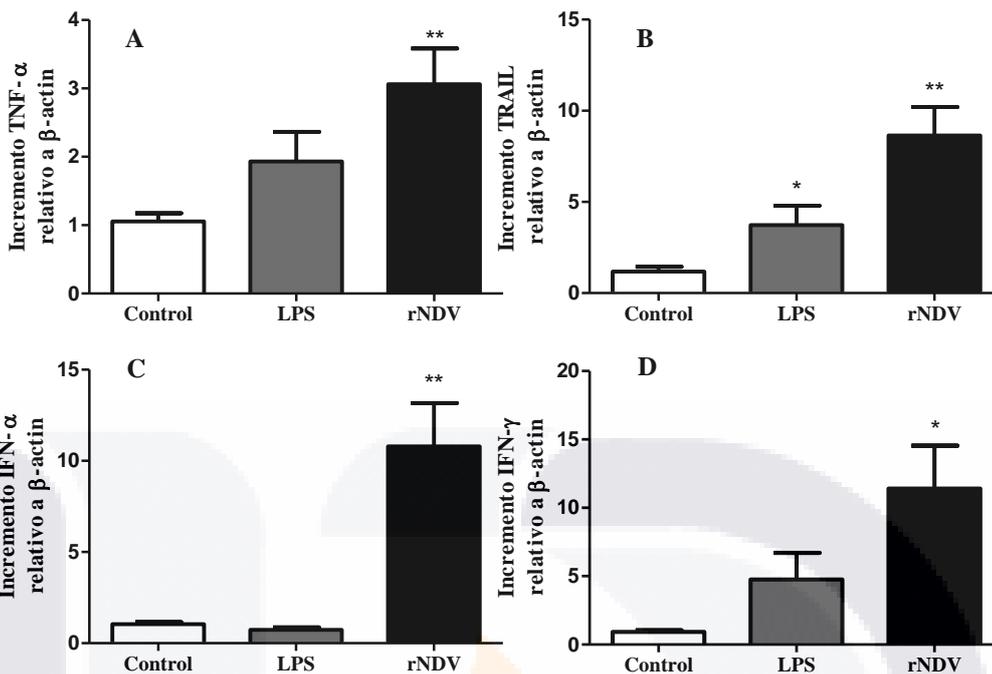


Figura 26. Evaluación de la expresión de citocinas en PBMC estimulada con rNDV-P05 mediante PCR cuantitativa.

Los cambios en la expresión de los genes (A) TNF- α , (B) TRAIL, (C) IFN- α y (D) IFN- γ se evaluaron a las 4 h después del co-cultivo con rNDV-P05 20HU/ml o LPS (5 μ g/ml). Las células de control se incubaron con PBS. El gen de β -actina se usó como gen de mantenimiento. Los resultados se presentan como la media \pm error estándar. Se usó ARN total de tres donantes sanos y se cuantificó por triplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ en comparación al control. PBMC, células mononucleares de sangre periférica; rNDV-P05, cepa de NDV atenuada recombinante P05; TNF- α , factor de necrosis tumoral- α ; TRAIL, ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral; IFN, interferón; LPS, lipopolisacárido; HU, unidades de hemaglutinación; PBS, solución salina tamponada con fosfato.

6.13- Efecto antitumoral de rNDV-P05 *in vivo*.

Para determinar si el virus rNDV-P05 posee capacidad antineoplásica *in vivo*, se estableció un modelo de cáncer de mama ortotópico singénico en ratones hembra Balb/c, inyectando en las glándulas mamarias células 4T1. Para evaluar la eficacia del virus reprimiendo el crecimiento del tumor, se evaluaron dos vías de administración, una sistémica y una intratumoral, la cual se explicó a detalle en la metodología antes planteada. De los dos sistemas de administración del virus que se utilizaron, el sistémico y el intratumoral, se observó que la administración sistémica mostró en general una mayor inhibición en el crecimiento del tumor al final del experimento, comparado con el grupo control al que solo se le administró PBS (Figura 27A y B). Así también, se observó que la mayoría de los animales del grupo control mostraron

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

señales de necrosis en el tumor desde el día 14 post inducción del tumor (DPIT), y dicha zona necrótica se mantuvo y extendió hasta el final del experimento, mientras que los animales del grupo tratado con rNDV-P05 apenas manifestaron signos de necrosis al termino del ensayo (Figura 27A y B). Por otro lado, la dosificación intratumoral de rNDV-P05 mostró una reducción apenas evidente en el volumen del tumor comparado al grupo control (Figura 27C y D). Además, en ambos grupos con dosificación intratumoral la aparición de zonas necróticas se fue manifestando a lo largo del ensayo.



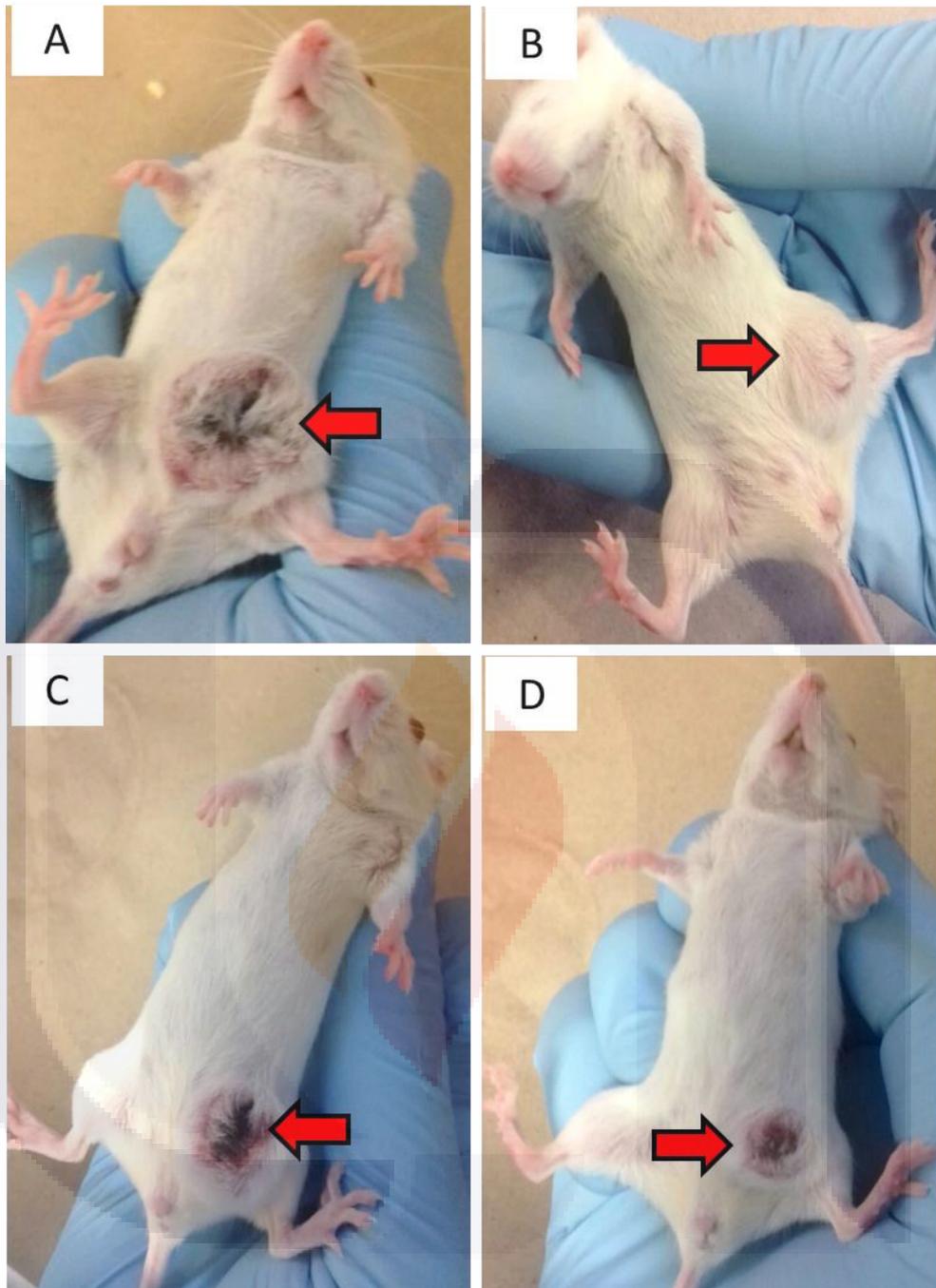


Figura 27. Efecto antitumoral de rNDV sobre el crecimiento de tumores de mama 4T1 en ratones Balb/c.

Los ratones hembra de 8 semanas de edad fueron inyectados con 5×10^4 células 4T1 para inducir tumores ortotópicos de mama. Las imágenes son representativas del modelo de administración sistémico, ya sea no tratado (A) o tratado (B) con rNDV. El modelo de administración intratumoral está constituido por el grupo tratado con PBS o control (C) y el tratado con rNDV (D). Al final del experimento (día 28 post inducción del tumor) se observa una disminución notable en el volumen del tumor en el grupo tratado con rNDV en el modelo de administración sistémico. Las flechas indican la posición del tumor en el cuerpo del ratón.

Otro de los parámetros que se evaluó fue la cinética de crecimiento del tumor midiendo el volumen del mismo. La cinética de crecimiento, para el modelo de administración sistémica (Figura 28A), muestra que al inicio del tratamiento (DPIT 7) ambos grupos tienen en promedio volúmenes similares ($p > 0.05$; rNDV = $19.72 \pm 2.58 \text{ mm}^3$; control = $18.96 \pm 2.40 \text{ mm}^3$) y dicha similitud se mantiene sin diferencia significativa a lo largo de los DPIT 11 ($p > 0.05$; rNDV = $61.70 \pm 9.43 \text{ mm}^3$; control = $80.80 \pm 11.27 \text{ mm}^3$) y DPIT 14 ($p > 0.05$; rNDV = $150.10 \pm 40.19 \text{ mm}^3$; control = $237.2 \pm 29.29 \text{ mm}^3$) aunque los valores promedio del volumen del tumor de los animales tratados fue inferior en ambos tiempos a los de los animales controles. Fue hasta el DPIT 17, después de una segunda dosis del rNDV-P05, que se observó una reducción significativa en el volumen del tumor de los animales tratados con rNDV con respecto al grupo control ($p < 0.01$; rNDV = $283.6 \pm 53.49 \text{ mm}^3$; control = $654.4 \pm 105.9 \text{ mm}^3$) y así se mantuvo hasta la conclusión del experimento (DPIT 21: $p < 0.01$; rNDV = $311.30 \pm 41.14 \text{ mm}^3$; control = $822.40 \pm 87.56 \text{ mm}^3$; DPIT 24: $p < 0.001$; rNDV = $516.90 \pm 61.38 \text{ mm}^3$; control = $1603 \pm 172.5 \text{ mm}^3$; DPIT 28: $p < 0.001$; rNDV = $876.2 \pm 126.7 \text{ mm}^3$; control = $1848 \pm 134.7 \text{ mm}^3$). Por otro lado, cuando el virus se administró de forma intratumoral al DPIT 7 el volumen de los tumores de ambos grupos eran similares ($p > 0.05$; rNDV = $19.44 \pm 2.59 \text{ mm}^3$; control = $13.32 \pm 2.54 \text{ mm}^3$) y solo se registró una tendencia a la reducción en el tamaño del tumor no significativa (DPIT 11: $p > 0.05$; rNDV = $42.26 \pm 8.140 \text{ mm}^3$; control = $53.02 \pm 12.61 \text{ mm}^3$; DPIT 14: $p > 0.05$; rNDV = $103.9 \pm 24.34 \text{ mm}^3$; control = $136.5 \pm 31.53 \text{ mm}^3$; DPIT 17: $p > 0.05$; rNDV = $342.9 \pm 78.77 \text{ mm}^3$; control = $393.8 \pm 75.72 \text{ mm}^3$; DPIT 21: $p > 0.05$; rNDV = $370.8 \pm 51.19 \text{ mm}^3$; control = $508.7 \pm 89.41 \text{ mm}^3$; DPIT 24: $p > 0.05$; rNDV = $661.8 \pm 138.9 \text{ mm}^3$; control = $935.5 \pm 160.3 \text{ mm}^3$; DPIT 28: $p > 0.05$; rNDV = $796.1 \pm 119.9 \text{ mm}^3$; control = $1409 \pm 293.1 \text{ mm}^3$) comparado al grupo control, durante todos los días evaluados (Figura 28B). Adicional a esto, se determinó que la dosificación sistémica e intratumoral no supone un problema en el desarrollo normal de los animales, por lo menos en lo que se refiere al peso corporal registrado entre los grupos control y los grupos rNDV (Figura 28C y D), ya que no hubo diferencia significativa a lo largo de todo el experimento ($p > 0.05$).

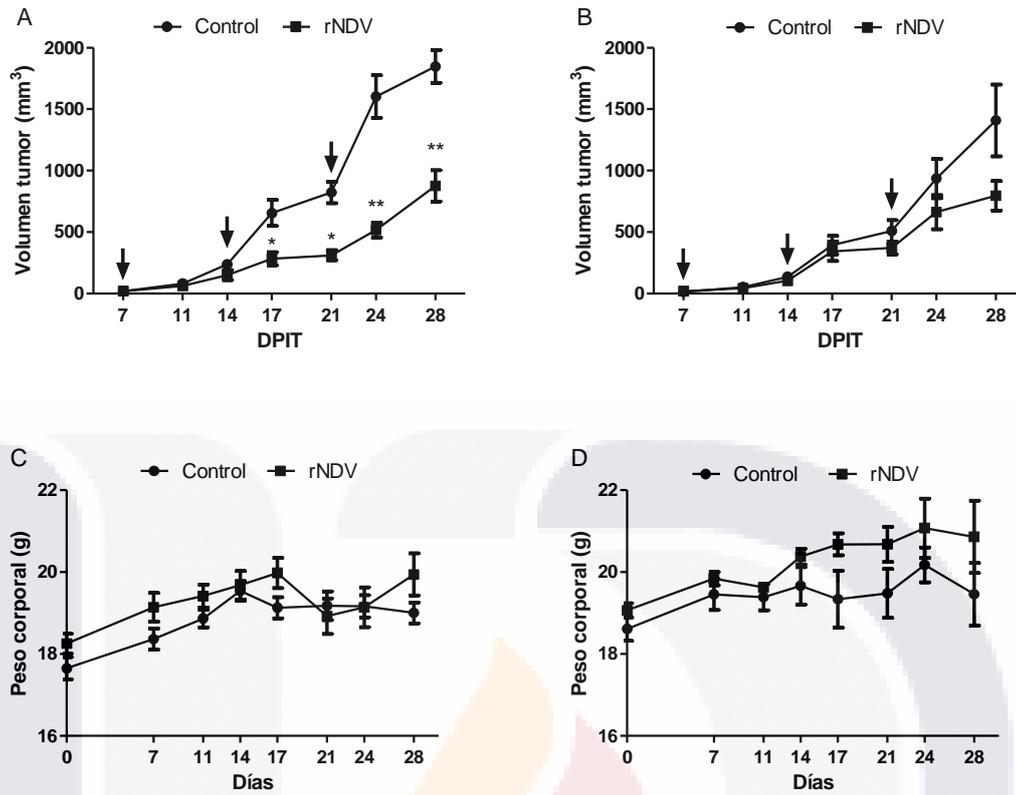


Figura 28. Efecto de rNDV-P05 sobre la línea tumoral 4T1 en ratón Balb/c y el peso corporal.

Cinética de crecimiento tumoral (mm^3) para cada grupo del modelo de administración sistémico (A) o intratumoral (B); cinética del peso corporal a lo largo del experimento para cada grupo del modelo de administración sistémico (C) o intratumoral (D). Las flechas indican los días en que se administró el virus (rNDV) o el vehículo (PBS; control), ya sea vía sistémica o intratumoral. Los datos se representan como la media \pm error estándar ($n=8$), excepto en los DPIT 21, 24 y 28 donde para el grupo rNDV del modelo sistémico (A) la $n=5$; para el modelo intratumoral hasta el DPIT 21 la $n=8$ y los DPIT 24 y 28 fue $n=7$ para ambos grupos. Las reducciones de animales en ambos modelos se debieron a una muerte súbita. * $p<0.01$; ** $p<0.001$ vs control. DPIT= días post inducción del tumor.

En orden de determinar concretamente el efecto antitumoral *in vivo* del rNDV-P05, además del volumen de los tumores, también se tomaron diferentes mediciones tanto del tumor como de órganos clave en la respuesta antitumoral. Por un lado, una vez terminado el ensayo y de sacrificados los animales, se extirparon los tumores y se pesaron, con lo cual se obtuvieron los siguientes pesos en promedio: administración sistémica, grupo control= $1.19 \pm 0.10\text{g}$; grupo rNDV= $0.90 \pm 0.08\text{g}$; y con administración intratumoral, grupo control= $0.80 \pm 0.15\text{g}$; grupo rNDV= $0.76 \pm 0.16\text{g}$. Una vez obtenidos los pesos de los tumores se analizó si existía diferencia significativa entre el grupo control y el tratado con rNDV, para ambos modelos de administración. Lo que se obtuvo fue que para los grupos con administración sistémica, los tratados con rNDV

redujeron considerablemente el peso de los tumores (Figura 29A), así también se pudo apreciar a simple vista la diferencia entre los tumores del grupo control con respecto al tratado con rNDV (Figura 30A y B). Además de esto, se calculó el porcentaje de inhibición tumoral, con lo que se observó que el grupo tratado con rNDV inhibió cerca de un 30% la masa (gramos) del tumor (Figura 29C). Por otro lado, para el modelo con administración intratumoral, no se logró encontrar diferencia significativa entre el grupo control y el tratado con virus, ya sea al medir la masa del tumor, en el porcentaje de inhibición tumoral o a simple vista (Figura 29B y D; Figura 30C y D). En segundo lugar se evaluó el porcentaje del índice del bazo, el cual se obtiene como el cociente entre el peso del bazo y el peso corporal del animal. Para el modelo con inyecciones sistémicas, el grupo control ($3.75 \pm 0.20\%$) mostró bazo alargados e hinchados, mientras que los tratados con rNDV ($2.73 \pm 0.15\%$) fueron significativamente menores de acuerdo al porcentaje del índice del bazo (Figura 29E; Figura 31A y B). Sin embargo, para el modelo con inyecciones intratumorales, el índice para el grupo control ($2.25 \pm 0.38\%$) y el tratado con rNDV ($3.59 \pm 0.52\%$) reveló índices similares (Figura 29F; Figura 31C y D). Estos datos sugieren que al menos el tratamiento vía intravenosa con el virus, tiene un efecto protector sobre el bazo, el órgano inmune primario del ratón.

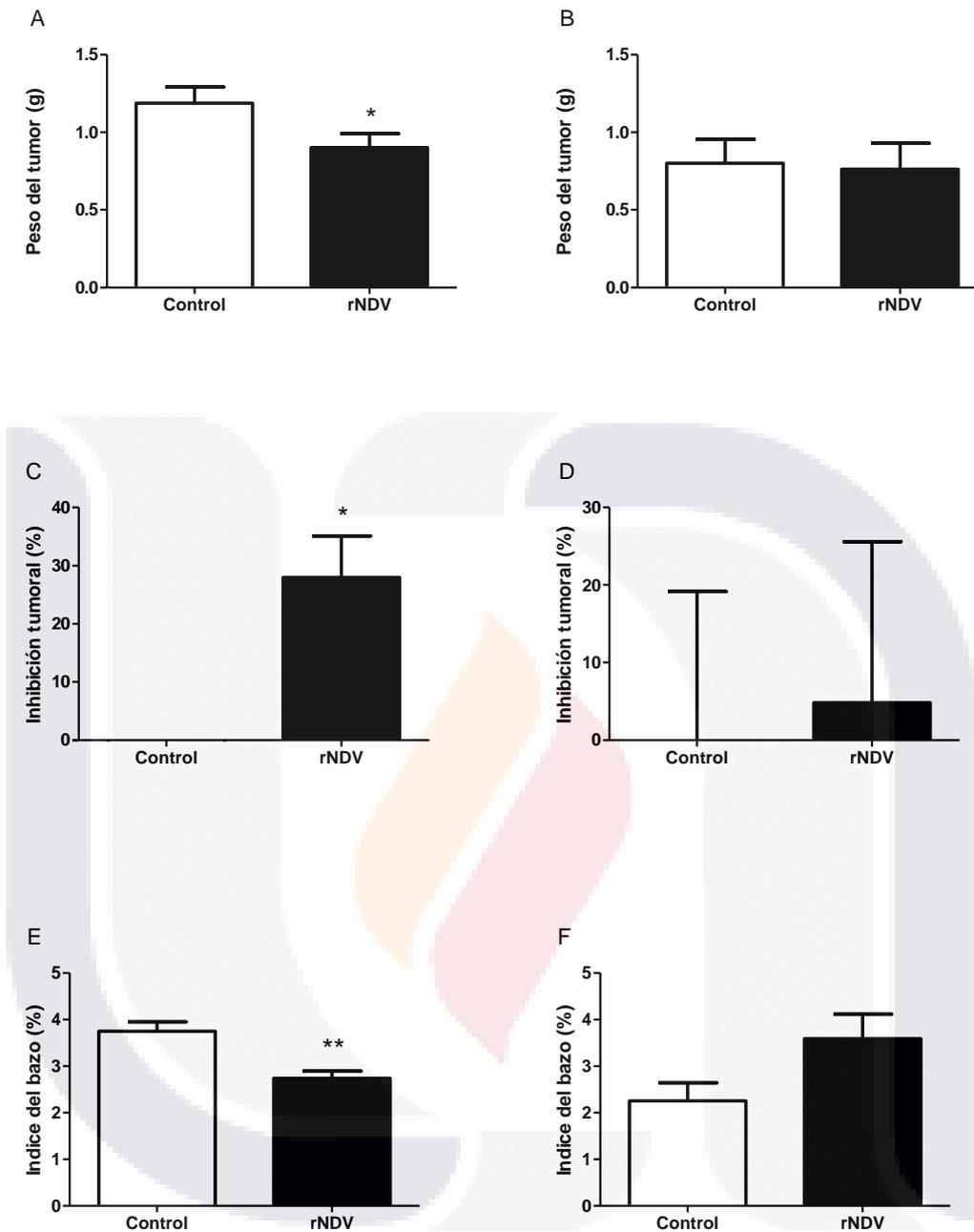


Figura 29. Efecto inhibitorio *in vivo* de rNDV-P05 sobre el crecimiento de la línea tumoral 4T1 en ratón Balb/c.

Peso en gramos del tumor al final del experimento (día 28 post inducción del tumor) para cada grupo del modelo de administración sistémico (A) o intratumoral (B); porcentaje de inhibición tumoral al final del experimento para el modelo de administración sistémico (C) o intratumoral (D); porcentaje del índice del bazo para el modelo de administración sistémico (E) o intratumoral (F). Los datos se representan como la media \pm error estándar. El número de animales por grupo al inicio del experimento fueron 8, y al término de este quedaron como sigue: control sistémico n=8; rNDV sistémico n=5; control y rNDV intratumoral n=7. *p<0.05; **p<0.01 vs control.

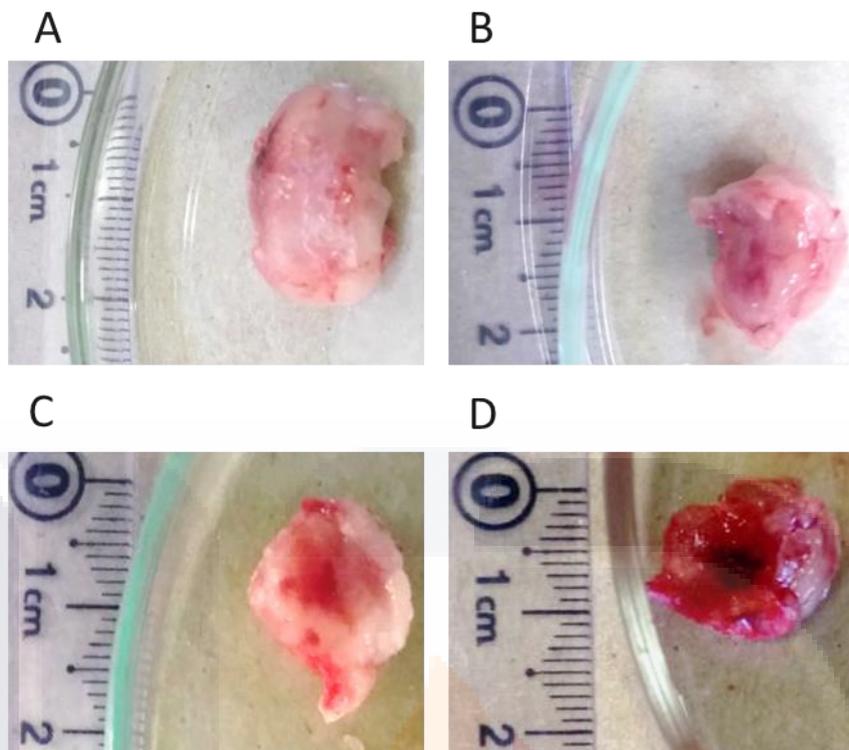


Figura 30. Efecto de rNDV-P05 en el tamaño de tumores de la línea 4T1 inducidos en ratones Balb/c.

Las imágenes A y B son representativas del modelo de administración sistémico, ya sea si fueron tratados con PBS (B) o rNDV-P05 (A); mientras que C (Control PBS) y D (tratado con rNDV-P05) representan al modelo de administración intratumoral. Las imágenes fueron tomadas justo después de ser extirpados los tumores al final del experimento (día 28 post inducción del tumor).

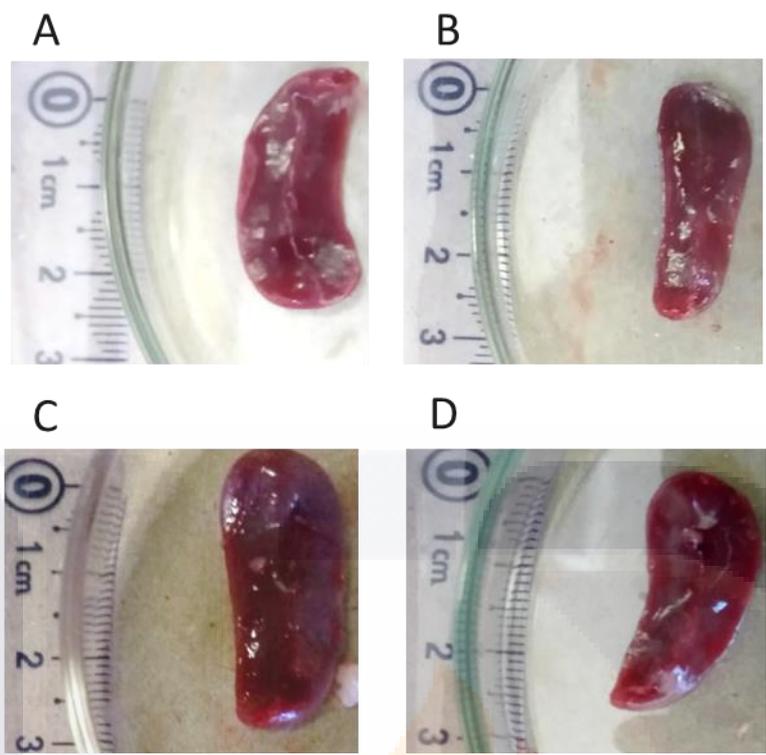


Figura 31. Bazos representativos de ratones Balb/c inducidos con tumor de mama 4T1. Las imágenes A y B pertenecen al modelo de administración sistémico, tratados con PBS (A) o rNDV-P05 (B); mientras que C (control PBS) y D (tratado con rNDV) representan al modelo de administración intratumoral. Las imágenes fueron tomadas justo después de ser extirpados los bazos al final del experimento (día 28 post inducción del tumor).

Finalmente, se evaluó la capacidad del rNDV-P05 de proteger a los ratones de un proceso de metástasis del tumor primario 4T1 hacia los pulmones. Para determinar lo anterior, un cultivo primario de tejido pulmonar se cultivó con un agente selectivo para las células tumorales 4T1 como se ha descrito en la metodología. Después de siete días de crecimiento bajo condiciones normales de cultivo, se determinó visualmente y cuantitativamente la presencia o no de colonias clonogénicas metastásicas de 4T1, las cuales se identificaron en mayor o menor medida en los diferentes modelos de administración y grupos dentro de cada modelo. Para el caso del modelo de administración sistémica, se observó una diferencia clara ($p < 0.01$) en la abundancia de las colonias clonogénicas entre el grupo tratado con rNDV-P05 (12.2 ± 4.3) y el grupo control (93.9 ± 15), siendo este último el que presentó la mayor cantidad de colonias clonogénicas en la mayoría de los animales (Figura 32 A, B y E). Por otro lado, el modelo de administración intratumoral no mostró una diferencia clara ($p > 0.05$) entre ambos grupos, el tratado con el virus (42.3 ± 13.9) y el control (34.4 ± 9.6). Se observó que un par de animales para cada grupo no mostró señales de la

presencia de colonias clonogénicas, mientras que en el resto de los animales la abundancia de colonias fue muy similar entre ambos grupos (Figura 32 C, D y F).

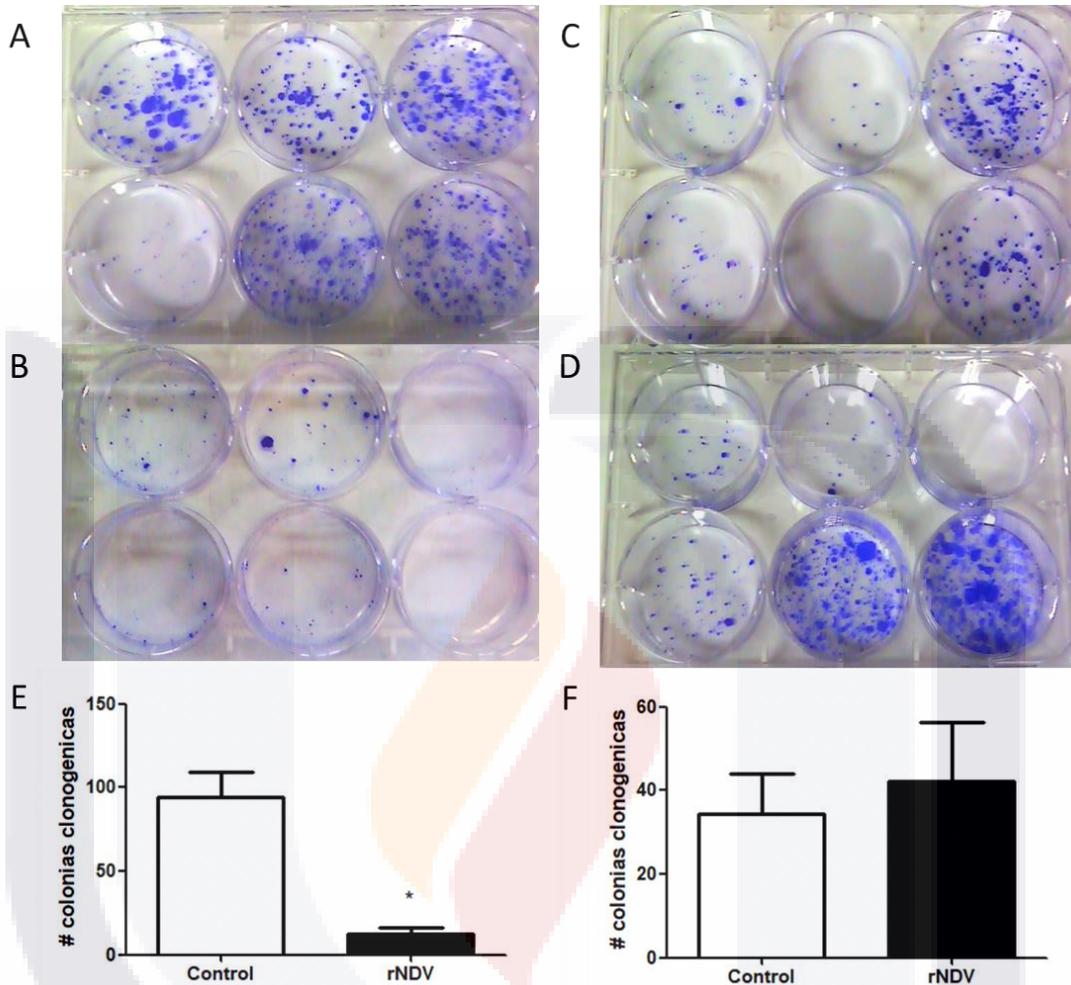


Figura 32. Cultivo primario de tejido pulmonar para la detección de colonias clonogénicas metastásicas de células 4T1.

Las imágenes son representativas de los modelos de administración y de los grupos de cada modelo. A (control) y B (tratado con rNDV) representan a los animales del modelo de administración sistémica; mientras que C (control) y D (tratado con rNDV) pertenecen al modelo de administración intratumoral. Análisis cuantitativo y estadístico del número de colonias clonogénicas metastásicas para el modelo sistémico (E) e intratumoral (F). Para cada pozo se sembró tejido pulmonar de un ratón, por lo que en la figura solo se muestran cultivos representativos de los animales de cada grupo. Dentro de cada pozo los puntos azul-violeta indican la presencia de una colonia clonogénica de 4T1. * $p < 0.01$ vs control.

7- DISCUSIÓN.

Expresión, purificación y evaluación de la actividad de la proteína HN.

Como ya se mencionó previamente, se produjo de manera transitoria en hojas cosechadas de *N. benthamiana* la proteína HN del NDV en un periodo de 6 días. La productividad fue de $\sim 1\mu\text{g/ml}$ ó $\sim 15\text{mg/kg}$ de peso fresco, de acuerdo al ensayo directo de ELISA. Estos rendimientos obtenidos son superiores a los obtenidos por (Gomez et al, 2009), sin embargo cabe señalar que para lo realizado en el presente trabajo se utilizó una plataforma de bioproducción basada en expresión transitoria, lo cual representa varias ventajas sobre otros sistemas de producción (Fisher et al, 2004). Por ejemplo el tiempo reducido de producción (6 días), altos rendimientos comparado a plantas transgénicas, la escalabilidad potencialmente ilimitada y la producción en instalaciones cerradas, lo cual empata con las especificaciones requeridas para llevar a cabo un proceso bajo Buenas Prácticas de Producción. Aunado a lo anterior, cabe señalar que la secuencia del gen *hn* utilizada en el presente trabajo proviene de una cepa de NDV clasificada como velogénica/genotipo V, a diferencia de trabajos previos (Gomez et al, 2009) donde la cepa usada fue LaSota, clasificada como lenteogénica/genotipo II. Esta distinción cobra relevancia debido a que es sabido de cierta forma que las cepas velogénicas o virulentas muestran una mayor capacidad oncolítica (Lam et al, 2011; Zamarin et al, 2012). Desafortunadamente, en el presente trabajo no se logró demostrar la actividad antitumoral de la proteína HN producida en tabaco, lo cual se atribuye principalmente a los bajos rendimientos obtenidos durante el proceso de purificación ($4.5 \pm 0.6\%$), a pesar de que se demostró que era biológicamente activa.

Además se logró determinar el tiempo adecuado de muestreo o cosecha post infiltración, siendo el día post infiltración (dpi) 5 el día que se eligió para la producción a escala mayor. Esto es importante ya que, determinar el mejor día para la extracción de la proteína expresada puede ayudar a tener mayores rendimientos en pasos posteriores de purificación, además de que ya se ha reportado previamente que la expresión puede aumentar o disminuir a lo largo de los días post infiltración (Arzola et al, 2011; Jung et al, 2015). En el caso específico de la proteína HN expresada transitoriamente en plantas de tabaco, solo se ha reportado su expresión hasta el dpi 2 (Gomez et al, 2009), sin embargo los autores no determinaron la cinética de expresión a varios dpi y solo se enfocaron en determinar la presencia de la proteína HN. En nuestro caso, logramos determinar una cinética de expresión a lo largo de diferentes dpi e incluso llegar a la purificación de la misma. Finalmente, la purificación de la proteína expresada es crucial para evaluar parámetros posteriores. En este sentido el

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

uso de una secuencia de poli-histidinas (6xHis-tag) en proteínas expresadas en plantas ha sido ampliamente utilizado para su purificación por IMAC, usando mayoritariamente níquel como metal de unión (Leelavathi y Reddy, 2003; Valdez-Ortiz et al, 2005; Vardakou et al, 2012; de Souza et al, 2014). En nuestro caso, se lograron optimizar las condiciones de purificación por IMAC, siendo el níquel el metal que presentó mayor afinidad por la proteína HN-tag. Sin embargo para la presente construcción usada, HN-tag, a pesar de que se pudo purificar satisfactoriamente no presentó actividad hemaglutinante frente a eritrocitos. Dicha ausencia de actividad biológica ya se ha reportado para otras proteínas con la secuencia His-tag, tanto en sistemas bacterianos como eucariotas (Woestenenk et al, 2004; Chant et al, 2005; Amor-Mahjoub et al, 2006; Renzi et al, 2006; Horchani et al, 2009; Sainsbury et al, 2009), atribuyéndose principalmente a la formación de polimerizaciones ligadas a la secuencias His-tag, tanto con la proteína recombinante como con otras proteínas nativas. Aunado a lo anterior, en los reportes que existen de la expresión ya sea transitoria o estable de la proteína HN en plantas, ninguno evalúa o reporta la actividad biológica de la misma (tabla 1), por lo que no podemos aseverar que la falta de actividad se deba a la expresión *per se* en *N. benthamiana*, además de que la construcción HN con una secuencia FLAG-tag demostró actividad hemaglutinante. Ligado a lo anterior, en la caracterización por Western blot se observó un barrido mayor a los 70kDa, lo cual puede indicar una polimerización de la proteína HN-tag con si misma o con otros elementos celulares de la planta. Dichas polimerizaciones ya se han reportado para otras proteínas con la secuencia His-tag (Woestenenk et al, 2004; Chant et al, 2005; Amor-Mahjoub et al, 2006; Renzi et al, 2006; Horchani et al, 2009; Sainsbury et al, 2009). Adicionalmente, este hecho ya lo demostramos con la proteína HN expresada en hojas cosechadas de *N. benthamiana*, donde se observó la presencia de la proteína HN en diferentes fracciones del lisado celular como el debris y microsomas, aunque esta versión de la proteína HN si presentó actividad hemaglutinante. Esto pudiera indicar que las secuencias tag (His-tag y 54-tag) usadas en la HN-tag, expresada en plantas completas de tabaco, promueven cierta interferencia en la actividad biológica de la proteína HN. En este sentido, solo podemos afirmar que las secuencias tag usadas en el presente estudio no fueron del todo favorecedoras ya sea dando bajos rendimientos en la purificación o interfiriendo en la actividad biológica de la proteína HN.

Actividad antitumoral e inmunoestimuladora de rNDV-P05 *in vitro*.

Recientemente, ha incrementado la atención hacia terapias alternativas con menos efectos secundarios que los tratamientos actuales contra el cáncer (quimio y

radioterapia). Un posible candidato de terapia alternativa es el uso de virus oncolíticos, especialmente el NDV, el cual ha demostrado la capacidad de matar células malignas como resultado de la activación de rutas apoptóticas, tanto *in vitro* como *in vivo* (Schirmacher, 2016; Zamarin y Palese, 20012). Sin embargo, ha sido reportado que la respuesta al tratamiento es dependiente de la cepa del NDV empleada (Schirmacher, 2016). En este sentido, nuestro objetivo fue determinar si una cepa de NDV velogénica de genotipo V atenuada recombinante (rNDV-P05) (Absalón et al, 2012; Garzón-Morales et al, 2013) posee actividad hemaglutinante, antitumoral e inmunoestimulante.

Primeramente, demostramos que rNDV-P05 tiene actividad hemaglutinante, la cual fue parcialmente disminuida bajo condiciones de pH ácidas y básicas, y totalmente a temperaturas mayores de 42°C. Estos datos, nos dieron una idea clara para el correcto manejo del virus. Nuestros resultados son similares a los descritos para la cepas LaSota y R2B (Rani et al), con la excepción de que rNDV-P05 permanece con el mismo título de hemaglutinación incluso a 42°C, mientras que en las cepas LaSota y R2B se redujo un título (Rani et al, 2014). Lo anterior cobra relevancia debido a que ha sido demostrado que, la actividad hemaglutinante juega un rol importante en la capacidad antitumoral e inmunoestimulante (Zeng et al 2002).

De acuerdo a la actividad antineoplásica de NDV, está muy claro que las cepas oncolíticas son mayormente velogénicas y que las cepas lentogénicas son más inmunoestimulantes que antiproliferativas (Schirmacher, 2016; Zamarin y Palese, 20012). A pesar de que rNDV-P05 expresa las proteínas HN y F de una cepa velogénica, este se replica como una lentogénica debido a que en la proteína F se reemplazó el sitio de corte de una secuencia de aminoácidos polibásicos a una de monobásicos (Garzón-Morales et al, 2013). Manteniendo esto en mente, nuestra siguiente meta caracterizando al rNDV-P05 fue explorar si el virus tenía la capacidad o no de inducir apoptosis sobre un panel de líneas tumorales provenientes de diferentes tejidos. En este estudio, se demuestra que rNDV-P05 fue capaz de inducir muerte celular programada sobre cuatro de las cinco líneas tumorales evaluadas, las cuales han mostrado susceptibilidad al NDV (Alabsi et al, 2011; Lv et al, 2013; Jiang et al, 2014; Rajmani et al, 2016). En tumores sólidos, esto es importante para la viroterapia, dado que la muerte celular inducida por el virus en el microambiente tumoral puede evocar no solo una inmunovigilancia tumor-específica local contra el tumor primario, sino también de manera sistémica sobre células malignas metastáticas. Este efecto puede ser mediado a través de la liberación de TAAs, DAMPs, PAMPs y citocinas inflamatorias que pueden ayudar a desarrollar una respuesta local y sistémica de tipo Th1 (Ni et al, 2011; Donnelly et al, 2013; Zamarin et al, 2014).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Aunado a lo anterior, es destacable de mencionar el hecho de que los anticuerpos neutralizantes (mayormente anti-HN y anti-F) pueden limitar la administración reiterada del virus (Seal et al, 2000) y por tanto disminuir su eficacia. En este sentido, diferentes propuestas como el uso de diferentes cepas virales o virus modificados para expresar diferentes glicoproteínas superficiales han sido consideradas (Zamarin y Palese, 2012). Ha sido demostrado que anticuerpos neutralizantes son cepa-específicos (Miller et al, 2007). En este sentido, el rNDV propuesto en el presente estudio podría ser considerado para viroterapia, no solo por el hecho de que pertenece a un genotipo diferente a los que pertenecen las cepas de NDV que normalmente se usan para viroterapia (Absalón et al, 2012), sino también debido a que mostró poseer una acción antitumoral muy prometedora contra diferentes líneas tumorales y además ser seguro cuando se co-cultivó con células normales (como lo son PBMC) de donantes sanos.

Adicionalmente a la actividad antitumoral de rNDV-P05, descubrimos que el virus tiene la capacidad de disparar la expresión de un grupo de citocinas involucradas en la remoción de células malignas, tales como TNF- α , IFN- α , TRAIL e IFN- γ . La citocina TNF- α es una proteína integrada a membrana y una citocina soluble con actividad antitumoral e inflamatoria (Balkwill et al, 1986; Talmadge et al, 1988; van der Veen et al, 2000; Seynhaeve et al, 2007). En este estudio, se registró que el rNDV-P05 desencadenó un incremento de TNF- α en el sobrenadante de PBMC en cultivo y una sobreexpresión temprana a nivel ARNm. Estudios previos *in vitro*, usando la cepa lítica 73T, mostró que indujo la sobreexpresión de TNF- α en el medio de cultivo después de 24h de estimulación (Zorn et al, 1994; Lorence et al, 1988). Otros reportes han demostrado la capacidad del virus para estimular la producción de esta citocina, aunque fue en macrófagos de ratón (Schirrmacher et al, 2000; Ahmed et al, 2014). En pacientes con tumores sólidos avanzados, la administración de una o múltiples dosis de la cepa lentogénica PV701 indujo la regresión de los tumores, paralelamente a un aumento en la cantidad en el suero de citocinas pro-inflamatorias, tales como TNF- α (Pecora et al, 2002). Así, la sobreexpresión de TNF- α puede estar involucrada en la actividad antitumoral de PBMC estimuladas con NDV.

Como miembro de la familia de TNF inductor de apoptosis, TRAIL ha exhibido su habilidad para eliminar un amplio rango de células malignas *in vitro* e *in vivo* (Ashkenazi et al, 1999; Walczak et al, 1999). Particularmente para el NDV, ha sido demostrada la sobreexpresión de TRAIL en la membrana de PBMC de humano estimulados con NDV Ulster, especialmente en subpoblaciones de monocitos y células T (Zeng et al, 2002). En otro estudio, monocitos de humano activados con NDV Ulster

potenciaron su citotoxicidad específica sobre diferentes líneas celulares, la cual fue dependiente de expresión de TRAIL y además fue comparable a monocitos activados con IFN- α (Washburn et al, 2003). Más recientemente, la cepa de NDV 7793 fue usada para activar células NK de ratón. Las células NK activadas con NDV 7793 sobreprodujeron TRAIL en membrana y en el sobrenadante respecto a las células sin tratar, y el efecto fue similar a las NK activadas con IFN- γ (Song et al, 2013). De acuerdo a lo obtenido en este trabajo, las PBMC de humano estimuladas con rNDV-P05 incrementan significativamente los niveles de TRAIL en el sobrenadante, así como la expresión de su ARNm. La expresión de TRAIL en células estimuladas con LPS fue solo significativa cuando se evaluó por qPCR; este resultado podría explicarse por el hecho de que los niveles de ARNm estarían reflejando las moléculas totales de TRAIL (anclado a membrana y soluble) mientras que los niveles de TRAIL en los sobrenadantes solo representan la versión soluble de la citocina. Debido al hecho de que registramos una sobreexpresión de ARNm de TRAIL en respuesta al estímulo con rNDV, podemos proponer que dicha sobreexpresión de TRAIL responde principalmente a un estímulo directo del virus, como ya se ha descrito (Vidalain et al, 2000; Chaperot et al, 2005). Sin embargo, es sabido que TRAIL puede ser inducido también por otras citocinas como IFN- α/β (Ehrlich et al, 2003; Griffith et al, 1999) e IFN- γ (Griffith et al, 1999; Fanger et al, 1999). De gran importancia es mencionar que durante la estimulación con el virus se registró una alta concentración en sobrenadante de IFN- α/γ , por lo que no se puede excluir el hecho de que parte del TRAIL soluble proviene de poblaciones de monocitos y/o células T estimuladas con IFN tipo I, como ya se ha reportado para dichas poblaciones celulares (Janke et al, 2007, Washburn et al, 2003).

La cinética de expresión de IFN- α por PBMC en respuesta a NDV ha sido evaluada previamente (Löseke et al, 2003). De acuerdo con el presente estudio, encontramos que la estimulación de PBMC de humano con rNDV, pero no con LPS, indujo una regulación a la alza del gen IFN- α en comparación al grupo control. A nivel de proteínas, también encontramos un aumento de IFN- α en los sobrenadantes de células estimuladas con rNDV en comparación al grupo control. Se ha reportado previamente de un incremento en la secreción de IFN- α en respuesta a las cepas líticas de NDV 73-T y Ulster (Zeng et al, 2002; Zorn et al, 1994). Sin embargo, en otro estudio que se utilizó NDV Ulster, la producción de IFN- α no fue detectada ni en poblaciones de monocitos ni en células dendríticas plasmacitoides (pDC) aisladas de PBMC de humano; solo una versión recombinante del virus que expresaba la citocina factor estimulante de colonia macrófago-granulocito (GM-CSF) fue capaz de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

incrementar significativamente los niveles de IFN- α (Janke et al, 2007). En este sentido, rNDV-P05 fue capaz de inducir la secreción de IFN- α en la cantidad previamente reportada para NDV Ulster (Janke et al, 2007) y sin la necesidad de expresar una citocina recombinante para desencadenarlo. También se han detectado niveles elevados de esta citocina en el suero de pacientes tratados con NDV (Pecora et al, 2002). La producción rápida de IFN- α es el mecanismo de primera línea de defensa después del contacto del virus con el sistema inmune innato, ya que posee propiedades antiproliferativas (Goodbourn et al, 2000; Onoguchi et al 2007; Ivashkiv et al, 2014), destacando la importancia de su producción durante la viroterapia.

De acuerdo con estudios anteriores, el papel que desempeña el IFN- γ en el efecto antitumoral durante la terapia con NDV no está claro. Por ejemplo, la estimulación de PBMC de humano con NDV 73-T durante 24h no aumentó la producción de esta citocina, al menos no a niveles detectables (Zorn et al, 1994). Un enfoque diferente utilizando células de cáncer de mama MCF-7 infectadas con NDV Ulster, como una vacuna tumoral, no fue capaz de inducir la secreción de IFN- γ en células T humanas después de cinco días de co-cultivo. Solo una versión recombinante del virus que expresa IL-2 mejoró la concentración de IFN- γ en el sobrenadante, en comparación con los grupos controles (Janke et al, 2008). Recientemente, empleando una cepa velogénica de genotipo VIII (AF2240) sobre PBMC de humano, se demostró la capacidad de esta cepa para estimular la producción de IFN- γ (Lam et al, 2014). Aquí, encontramos que las PBMC (excepto del donante 4) responden a rNDV-P05 y a LPS con una sobreproducción en la secreción de IFN- γ . También se observó un aumento en el nivel de ARNm. Nuestros resultados destacan que aunque el rNDV-P05 se atenúa de forma recombinante, desencadena un efecto similar cuando se compara con una cepa velogénica (Lam et al, 2014), sin necesidad de la expresión de citocinas recombinantes, como IL-2 (Janke et al, 2008). La regulación a la alza en IFN- γ inducida por rNDV en PBMC de humano podría ser beneficiosa *in vivo*, debido a que el IFN- γ participa en la activación de la inmunidad anticancerígena (células T, células NK y DC), en la inhibición de la actividad de células inmunosupresoras (células T reguladoras y células supresoras derivadas de mieloides), así como en la conversión de macrófagos asociados a tumores (Schroder et al, 2004; Parker et al, 2016).

Actividad antitumoral de rNDV-P05 *in vivo*. La línea celular de carcinoma mamario de ratón 4T1, es una línea celular de cáncer de mama triple negativo, la cual está bien documentada por ser muy agresiva y altamente metastática (Pulaski y Ostrand-Rosenberg, 1998; Baliga et al, 2005). Los tumores de mama primarios

establecidos en ratones Balb/c usando la línea celular 4T1 son un modelo bien reconocido de simular cáncer de mama metastático o cáncer de mama fase IV, el cual típicamente hace metástasis en pulmón e hígado (Lin et al, 2015; Chen et al, 2017). Como ya se demostró en la fase *in vitro* (Ortega-Rivera et al, 2017), el rNDV-P05 presentó actividad antitumoral contra un panel de diferentes líneas cancerígenas, entre ellas una de cáncer de mama doble negativo (carcinoma de mama HCC1954). De este modo, en el presente trabajo nos dimos a la tarea de determinar si el rNDV-P05 presenta actividad antitumoral *in vivo* en un modelo de cáncer de mama ortotópico y singénico en ratón.

A la fecha, está documentado el desarrollado de diferentes terapias para el tratamiento de cáncer de mama usando el modelo 4T1 (Kim et al 2011; Liu et al 2012; Bailey-Downs et al 2014; Chen et al 2017) incluyendo el uso de virus oncolíticos (Ebert et al 2005; Le Boeuf et al 2017), y para los cuales la eficacia en cuanto a la reducción en el tamaño del tumor primario o la inhibición de un proceso de metastasis es variable. Sin embargo, es interesante mencionar que a la fecha solo existe un trabajo publicado con este modelo de cáncer de mama utilizando el NDV como agente terapéutico (Motalleb et al, 2009). A pesar de que en dicho trabajo se utiliza una cepa del virus (NDV-AF2240) que ya ha demostrado actividad antitumoral *in vitro* sobre diferentes líneas tumorales (Assayaghi et al, 2016; Alabsi et al, 2011; Ahmad et al, 2015), los autores no lograron demostrar reducción alguna en el tamaño de los tumores primarios, ni siquiera por el hecho de que usaron un tratamiento combinado con tamoxifén, una droga ampliamente usada para quimioterapia. En nuestro caso, no se observó una reducción significativa ni en el volumen ni en la masa del tumor cuando el tratamiento se administró vía intratumoral, que fue la misma vía de administración que usaron Motalleb et al (2009), además de que nosotros usamos una dosis de 1,000HU semanal, mientras que los autores mencionados usaron una dosis máxima de 64HU diaria, lo cual parece indicar que la cantidad y frecuencia de la dosis no tiene un efecto relevante sobre los tumores 4T1. Sin embargo, cuando el virus se inyectó vía sistémica el crecimiento del tumor primario se vio inhibido significativamente, lo cual indica que para el presente modelo de cáncer de mama, la mejor vía de administración es la sistémica, ya que adicionalmente a nuestros resultados, existen reportes en condiciones y con resultados similares a los nuestros pero utilizando el virus de la estomatitis vesicular (Ebert et al 2005; Le Boeuf et al 2017). Por otro lado, cabe mencionar que ya se ha probado la eficacia del NDV usando diferentes vías de administración con modelos de cáncer de colon y linfoma en ratones inmunocompetentes (Schirmacher et al 2001). Dicho estudio hace uso de dos

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

cepas, una velogenica (73T) y otra lentogenica (Ulster) y usando multiples dosis de 1,000HU lograron inhibir el crecimiento del tumor de colon solo con la cepa Ulster, mediante administración intratumoral, mientras que con la administración sistémica no observaron algún efecto antitumoral con ambas cepas. De la misma manera, el tratamiento proporcionado vía intravenosa para combatir linfoma, tampoco tuvo un efecto favorable sobre los animales tratados con ambas cepas del virus. Estos resultados junto con lo obtenido por nuestro estudio ejemplifica claramente como la actividad antitumoral del virus de Newcastle obedece a tres variables clave: i) la cepa que se use, ii) el tipo de cáncer a tratar y, iii) la vía de administración del virus. Por ello es de gran importancia enfocarse más en los mecanismos antitumorales e inmunoestimuladores del virus, sobre todo de la cepa rNDV-P05, para así poder predecir mejor el efecto que tendrá sobre los pacientes.

Adicional a lo que se reporta en los trabajos con el modelo 4T1 anteriormente mencionados, donde solo se evalúa el volumen y la masa del tumor inducido (Motalleb et al 2009), nosotros decidimos examinar otras variables importantes en este modelo, sobre todo el efecto en órganos clave en la respuesta inmune como el bazo y la presencia de metástasis en pulmón. Estas variables adicionales ya han sido reportadas como indicadores importantes al momento de declarar la eficacia o no de cualquier terapia en un modelo de cáncer de mama inducido con la línea 4T1 (Pulaski y Ostrand-Rosenberg, 1998; Kim et al 2011; Liu et al 2012; Bailey-Downs et al 2014; Chen et al 2017; Le Boeuf et al 2017). En lo que a nosotros concierne, el tratamiento con el virus rNDV-P05 inyectado vía intravenosa, reduce claramente la presencia de colonias clonogénicas metastásicas 4T1 en los pulmones, e incluso hubo animales en donde no se detectó la presencia de éstas, lo cual es de gran importancia ya que la baja prognosis para pacientes con cáncer de mama fase IV se debe en gran medida a la presencia de metástasis en órganos distintos a la glándula mamaria.

El mecanismo por el cual el virus está inhibiendo tanto el tamaño del tumor primario como el proceso de metástasis en pulmón, no se exploró en el presente trabajo. Sin embargo, debido a que el tratamiento por vía intravenosa demostró ser eficaz tanto en inhibir el crecimiento del tumor primario como en reducir la presencia de colonias clonogénicas metastáticas 4T1 en los pulmones, podemos especular que la efectividad de la terapia es debida en parte a un proceso inmunoestimulante por parte del virus y no solo a su capacidad oncolítica directa sobre las células 4T1. Esto lo podemos sugerir debido a que ya hemos reportado la habilidad estimulante del rNDV-P05 sobre PBMC de humano *in vitro* (Ortega-Rivera et al, 2017), donde se observó una sobre expresión a nivel de ARN y proteína de citocinas involucradas

directa (TRAIL y TNF- α) o indirectamente (IFN- α e IFN- γ) en el proceso antineoplásico. Además de que ya se ha corroborado que la inducción de citocinas antitumorales por el NDV es capaz de reclutar o activar células involucradas en la inmunovigilancia como células Th1 CD4+, células T citotóxicas CD8+ y células NK, reflejándose finalmente en la inhibición de la proliferación de células malignas (Zamarin et al 2009; Ni et al 2011). En este sentido, es necesario realizar estudios más a fondo para determinar exactamente que mecanismo influye en los resultados obtenidos en el presente estudio. Así también sería interesante valorar si el efecto antitumoral pudiera ser incrementado al combinarse con otro tipo de terapias, ya sean convencionales como la quimioterapia o alternativas como la inmunoterapia.



8- CONCLUSIÓN.

La proteína HN expresada en hojas cosechadas de *N. benthamiana* y purificada con el kit comercial ANTI-FLAG® M2 Magnetic Beads posee actividad biológica, aunque el rendimiento en su producción es muy bajo. La recuperación de la proteína mediante precipitación metanol/cloroformo es mayor pero pierde su actividad biológica. La filtración con un poro de 0.22 μm reduce la concentración de la proteína HN en la muestra al localizarse en fracciones microsomales y debris celular, lo cual provoca que gran parte de esta quede retenida en el filtro junto con dichas fracciones. Se puede expresar la proteína HN-tag en plantas completas de *N. benthamiana* y se purifica satisfactoriamente mediante el sistema IMAC, sin embargo la proteína purificada no muestra actividad hemaglutinante. Dado lo anterior, no se pudo evaluar la actividad antitumoral e inmunoestimuladora de la proteína HN expresada en *N. benthamiana*.

Para la evaluación de la cepa rNDV-P05 hay una respuesta heteróloga de las células tumorales e inmunes después de la estimulación con rNDV-P05 y es notable que el genotipo de la cepa aplicada para la viroterapia parezca ser, al menos en parte, la razón de este efecto. Este estudio muestra por primera vez que un genotipo V de NDV posee actividades antitumorales e inmunoestimuladoras. Debido a que el rNDV-P05 mostró una actividad antitumoral prometedora y fue capaz de estimular la expresión de cuatro citocinas antitumorales clave (TNF- α , IFN- α , TRAIL e IFN- γ).

La evaluación del rNDV-P05 en un modelo ortotópico singénico de cáncer de mama inducido con células 4T1 en ratón Balb/c, muestra que la administración por vía sistémica del virus reduce significativamente la masa y volumen del tumor, el índice del bazo y la abundancia de colonias clonogénicas metastásicas en tejido pulmonar, así como aumenta el índice de inhibición del tumor. El modelo de administración intratumoral con rNDV-P05 es inefectivo para todos los parámetros evaluados. En este sentido, es necesario realizar estudios más a fondo para determinar exactamente que mecanismo influye en los resultados obtenidos en el presente estudio, así también sería interesante valorar si el efecto antitumoral pudiera ser incrementado al combinarse con otro tipo de terapias ya sean convencionales como la quimioterapia o alternativas como la inmunoterapia.

REFERENCIAS.

- Absalón AE, Mariano-Matías A, Vásquez-Márquez A, Morales-Garzón A, Cortés-Espinosa DV, Ortega-García R and Lucio-Decanini E. 2012. Complete genome sequence of a velogenic Newcastle disease virus isolated in Mexico. *Virus Genes*. 45: 304-310.
- Ackermann W and Kurtz H. 1952. A new host-virus system. *Proc Soc Exper Biol Med*. 81: 421-423.
- Ahlert T and Schirmmacher V. 1990. Isolation of a human melanoma adapted Newcastle disease virus mutant with highly selective replication patterns. *Cancer Res*. 50(18): 5962–5968.
- Ahmad U, Ahmed I, Keong YY, Manan NA and Othman F. 2015. Inhibitory and Apoptosis-Inducing Effects of Newcastle Disease Virus Strain AF2240 on Mammary Carcinoma Cell Line. *BioMed Res Int*. 15: 1-12.
- Alabsi AM, Abu Bakar SA, Ali R, Omar AR, Bejo MH, Ideris A and Ali AM. 2011. Effects of Newcastle Disease Virus Strains AF2240 and V4-UPM on Cytolysis and Apoptosis of Leukemia Cell Lines. *Int. J. Mol. Sci*. 12: 8645-8660.
- Aldous EW and Alexander DJ. 2008. Newcastle disease in pheasants (*Phasianus colchicus*): a review. *Vet J*. 175:181-185.
- Alexander DJ. 1989. A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, ed. by H.G. Purchase, L.H. Arp, C.H. Domermuth, J.E. Pearson (American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, p. 114.
- Alexander DJ. 1991. Newcastle Disease and other Paramixovirus Infection. In: *Diseases of Poultry*, 9th ed. Chap. 19. B.W. Calneak, H.J., Barnes, W.M. Reid, and H.W. Yoder, Jr. Eds. The Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 496-512.
- Alexander DJ. 2001. Newcastle disease. *Br. Poult. Sci*. 42:5-22.
- Alexander DJ, Hewlett G, Reeve P, and Poste G. 1973. "Studies on the cytopathic effects of Newcastle disease virus the cytopathogenicity of strain Herts 33 in five cell types," *J Gen Virol*. 21 (2): 323-337.
- Amor-Mahjoub M, Suppini JP, Gomez-Vrielyunck N, Ladjimi M. 2006. The effect of the hexahistidine-tag in the oligomerization of HSC70 constructs. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 844(2): 328-234.
- Arzola L, Chen J, Rattanaporn K, Maclean JM and McDonald KA. 2011. Transient Co-Expression of Post-Transcriptional Gene Silencing Suppressors for Increased in Planta Expression of a Recombinant Anthrax Receptor Fusion Protein. *Int. J. Mol. Sci*.12: 4975-4990.

- Assayaghi RM, Alabsi AM and Ali AM. 2016. Apoptosis Induction of Newcastle Disease Virus Strains (AF2240 and V4-UPM) on HT-29 Human Colorectal Adenocarcinoma Cells. *J Canc Res Ther.* 4: 18.
- Avki S, Turutoglu H, Simsek A, and Unsal A. 2004. Clinical and immunological effects of Newcastle disease virus vaccine on bovine papillomatosis. *Vet Immunol Immunop.* 98 (1-2): 9-16.
- Bailey-Downs LC, Thorpe JE, Disch BC, Bastian A, Hauser PJ, Farasyn T, Berry W L, Hurst R E and Ihnat M A. 2014. Development and Characterization of a Preclinical Model of Breast Cancer Lung Micrometastatic to Macrometastatic Progression. *PLoS ONE.* 9(5): 1-12.
- Baliga, MS, Meleth, S and Katiyar, SK. 2005. Growth inhibitory and antimetastatic effect of green tea polyphenols on metastasis-specific mouse mammary carcinoma 4T1 cells in vitro and in vivo systems. *Clin. Cancer Res.* 11, 1918-1927.
- Baselga J, Cortes J, Kim SB, Im SA Hegg R, Im YH, Roman L, Pedrini JL, Pienkowski T, Knott A, Clark E, Benyunes MC, Ross G, Swain SM and Cleopatra SG. 2012. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 366: 109-119.
- Bayne A-CV, Lippmeier JC, Emil K, Guo X, and Pritchard JA. 2011. Patent US 2011/0195480 A1.
- Berinstein A, Vazquez-Rovere C, Asurmendi S, Gomez E, Zanetti F, Zabal O, Tozzini A, Grand DC, Taboga O, Calamante G, Barrios H, Hopp E and Carrillo E. 2005. Mucosal and systemic immunization elicited by Newcastle disease virus (NDV) transgenic plants as antigens. *Vaccine.* 23: 5583-5589.
- Bertani G. 1951. Studies on lysogenesis I, the mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 62: 293-300.
- Bian H, Wilden H, Fournier P, Peeters B, and Schirmacher V. 2006. In vivo efficacy of systemic tumor targeting of a viral RNA vector with oncolytic properties using a bispecific adapter protein. *Int J Oncol.* 29 (6): 1359-1369.
- Boehm R. 2007. Bioproduction of therapeutic proteins in the 21st century and the role of plants and plant cells as production platforms. *Ann NY Acad Sci.* 1102: 121-134.
- Bohle W, Schlag P, Liebrich W, Hohenberger, P, Manasterski M, Möller P and Schirmacher V. 1990. "Postoperative active specific immunization in colorectal cancer patients with virusmodified autologous tumor-cell vaccine. First clinical

results with tumor-cell vaccines modified with live but avirulent Newcastle disease virus," *Cancer*. 66(7): 1517-1523.

- Cassel WA and Garrett RE. 1965. Newcastle disease virus as an antineoplastic agent. *Cancer*. 18: 863-868.
- Cardineau GA, Mason HS, Vaneck JM, Kirk DD and Walmsley AM. 2010. WO 2004/098533.
- Chambers P, Nesbit M, Yusoff K, Millar NS, Samson AC and Emmerson PT. 1988. Location of a neutralizing epitope for the haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of Newcastle disease virus. *J Gen Virol*. 69: 2115-2122.
- Chang A and Dutch RE. 2012. Paramyxovirus Fusion and Entry: Multiple Paths to a Common End. *Viruses*. 4: 613-636.
- Chant A, Kraemer-Pecore CM, Watkin R, Kneale GG. 2005. Attachment of a histidine tag to the minimal zinc finger protein of the *Aspergillus nidulans* gene regulatory protein AreA causes a conformational change at the DNA-binding site. *Protein Expr Purif*. 39(2): 152-159.
- Chen C, Nong Z., Xie Q., He J., Cai W., Tang X., Chen X., Huang R., and Gao Y. 2017. 2-Dodecyl-6 methoxycyclohexa-2,5-diene-1,4-dione inhibits the growth and metastasis of breast carcinoma in mice. *Sci Rep-UK*. 7: 1-12.
- Crennell S, Takimoto T, Portner A and Taylor G. 2000. Crystal structure of the multifunctional paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase. *Nat Struct Biol*. 7: 1068–1074.
- Csatory LK. 1971. Viruses in the treatment of cancer. *The Lancet*. 2 (7728): 825.
- Csatory LK and Bakacs T. 1999. Use of Newcastle disease virus vaccine (MTH-68/H) in a patient with high-grade glioblastoma. *J Amer Med Assoc*. 281 (17): 1588-1589.
- Csatory LK, Eckhardt S, Bukosza I, Czegldi F, Fenyvesi C, Gergely P, Bodey B and Csatory CM. 1993. Attenuated veterinary virus vaccine for the treatment of cancer. *Cancer Detect Prev*. 17 (6): 619-627.
- Czeglédi A, Ujvari D, Somogyia E, Wehmanna E, Werner O and Lomniczi B. 2006. Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. *Virus Res*. 120: 36-48.
- Danial NN and Korsmeyer SJ. 2004. Cell death: critical control points. *Cell*. 116: 205-219.

- De Leeuw OS and Peeters B. 1999. Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae. *J Gen Virol.* 80: 131-136.
- De Souza A, Hull PA, Gille S, Pauly M. 2014. Identification and functional characterization of the distinct plant pectin esterases PAE8 and PAE9 and their deletion mutants. *Planta.* 240(5): 1123-1138.
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ and Schreiber RD. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 3: 991-998.
- Dunn GP, Koebel CM and Schreiber RD. 2006. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 836-848.
- Dunn GP, Old LJ and Schreiber RD. 2004. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity.* 21: 137–48.
- Dunn GP, Old LJ and Schreiber RD. 2004. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol.* 22: 329-360.
- Fiola C, Peeters B, Fournier P, Arnold A, Bucur M and Schirmacher V. 2006. Tumor selective replication of Newcastle disease virus: association with defects of tumor cells in antiviral defence. *Int J Cancer.* 119(2): 328-38.
- Fischer R and Emans N. 2000. Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgen Res.* 9: 279-99.
- Fischer R, Stoger E, Schillberg S, Christou P and Twyman RM. 2004. Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr Opin Plant Biol;* 7: 152-158.
- Flint SJ, Enquist LW, Racaniello VR and Skalka AM. 2007. Attachment and entry, in *Principles of Virology, Molecular Biology, Pathogenesis, and Control of Animal Viruses*, ASM Press, Washington, DC, USA, 2nd edition, p. 158.
- Freeman AI, Zakay-Rones Z, Gomori JM, Linesky E, Rasooly L, Greenbaum E, Rozenman-Yair S, Panet A, Libson E, Irving CS, Galun E and Siegal T. 2006. Phase I/II trial of intravenous NDV-HUJ oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme. *Mol Ther.* 13 (1): 221-228.
- Gallagher SR. 2011. Unit 7.3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). *Curr Protoc Essent Lab Tech* 2012: 1-28.
- Garzón-Morales JA, Lucio-Decanini E, Cortes-Espinosa DV and Absalón-Constantino AE. Newcastle disease virus and the use thereof as a vaccine. US Patent 2013/0315956 A1. Filing date: November 18, 2011. Publication date: November 28, 2013.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Gerl R, Vaux DL. 2005. Apoptosis in the development and treatment of cancer. *Carcinogenesis*. 26: 263-270.
 - Gómez E, Zoth SC, Asurmendi S, Vázquez Rovere C and Berinstein A. 2009. Expression of hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of Newcastle disease Virus in agroinfiltrated *Nicotiana benthamiana* plants. *J. Biotechnol.* 144: 337-340.
 - Gravel KA and Morrison TG. 2003. Interacting domains of the HN and F proteins of Newcastle disease virus. *J Virol.* 77: 11040-11049.
 - Guerrero-Andrade O, Loza-Rubio E, Olivera-Flores T, Fehérvári-Bone T, Gómez-Lim MA. 2006. Expression of the Newcastle disease virus fusion protein in transgenic maize and immunological studies. *Transgenic Res.*15: 455-463.
 - Hahn BS, Jeon IS, Jung YJ, Kim JB, Park JS, Ha SH, Kim KH, Kim, HM, Yang JS, Kim YH. 2007. Expression of hemagglutinin- neuraminidase protein of Newcastle disease virus in transgenic tobacco. *Plant Biotechnol Rep.* 1: 85-92.
 - Haas C, Strauß G, Moldenhauer G, Iorio RM, and Schirmacher V. 1998. Bispecific antibodies increase T-cell stimulatory capacity in vitro of human autologous virus-modified tumor vaccine. *Clinical Cancer Res.* 4 (3): 721-730.
 - Heicappell R, Schirmacher V, and Von Hoegen P. 1986. Prevention of metastatic spread by postoperative immunotherapy with virallymodified autologous tumor cells. I. Parameters for optimal therapeutic effects. *Int. J. Cancer.* 37(4): 569-577.
 - Hines NL and Miller CL. 2012. Avian Paramyxovirus Serotype-1: A Review of Disease Distribution, Clinical Symptoms, and Laboratory Diagnostics. *Veterinary Med Int.* 1: 1-17.
 - Horchani H, Quertani S, Gargouri Y, Sayari A. 2009. The N-terminal His-tag and the recombination process affect the biochemical properties of *Staphylococcus aureus* lipase produced in *Escherichia coli*. *J. Mol. Catal. B Enzyme* 61 194–201.
 - Hotte SJ, Lorence RM, Hirte HW, Polawski SR, Bamat MK, O'Neil JD, Roberts MS, Groene WS and Major PP. 2007. An optimized clinical regimen for the oncolytic virus PV701. *Clinical Cancer Res.* 13 (3): 977-985.
 - Hrabak A, Csuka I, Bajor T, and Csatory LK. 2006. The cytotoxic anti-tumor effect of MTH-68/H, a live attenuated Newcastle disease virus is mediated by the induction of nitric oxide synthesis in rat peritoneal macrophages in vitro. *Cancer Lett.* 231(2): 279-289.

- lorio RM, Melanson VR and Mahon PJ. 2009. Glycoprotein interactions in paramyxovirus fusion. *Future Virol.* 4: 335-351.
- Janke M, Peeters B, and De Leeuw O. 2007. Recombinant Newcastle disease virus (NDV) with inserted gene coding for GM-CSF as a new vector for cancer immunogene therapy. *Gene Ther.*14: 1639-1649.
- Janke M, Peeters B, Zhao H, De Leeuw, O, Moorman, R, Arnold A, Ziouta Y, Fournier P and Schirmmacher V. 2008. Activation of human T cells by a tumor vaccine infected with recombinant Newcastle disease virus producing IL-2. *International J Oncol.* 33 (4): 823-832.
- Jarahian M, Watzl C, Fournier P, Arnold A, Djandji D, Zahedi S, Cerwenka A, Paschen A, Schirmmacher V, and Momburg F. 2009. Activation of natural killer cells by Newcastle disease virus hemagglutinin–neuraminidase. *J Virol.* 83(16): 8108-8121.
- Jung S-K, McDonald KA, and Dandekar AM. 2015. Effect of leaf incubation temperature profiles on *agrobacterium tumefaciens*-mediated transient expression. *Biotechnol Progress*, 31: 783-790.
- Karcher J, Dyckhoff G, Beckhove P, Reisser C, Brysch M, Ziouta Y, Helmke B H, Weidauer H, Schirmmacher V, and Herold-Mende C. 2004. Antitumor vaccination in patients with head and neck squamous cell carcinomas with autologous virus-modified tumor cells. *Cancer Res.* 64 (21): 8057-8061.
- Karg SR and Kallio PT. 2009. The production of biopharmaceuticals in plant systems, *Biotechnol Adv.* 27(6):879–894.
- Kawai T and Akira S. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.*11: 373-384.
- Knipe DM and Hetsley PM. 2001. Paramyxoviridae: the viruses and their replication, in *Fields Virology*, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Pa, USA, 4th edition, pp. 1305-1306–1324.
- Lai KS, Yusoff K and Mahmood M. 2012. Heterologous expression of hemagglutinin-neuraminidase protein from Newcastle disease virus strain Af2240 in *Centella Asiatica*. *Acta Biol Cracov Bot.* 54: 142-147.
- Lai KS, Yusoff K and Mahmood M. 2013. Functional ectodomain of the hemagglutininneuraminidase protein is expressed in transgenic tobacco cells as a candidate vaccine against Newcastle disease virus. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 112: 117-121.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Lakatos L, Szittyá G, Silhavy D, and Burgyán J. 2004. Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *The EMBO Journal*. 23(4): 876-884.
 - Lam HY, Yeap SK, Rasoli M, Omar AR, Yusoff K, Suraini AA, and Alitheen NB. 2011. Safety and Clinical Usage of Newcastle Disease Virus in Cancer Therapy. *J Biomed Biotechnol*. 1: 1-13.
 - Lamb RA and Jardetzky TS. 2007. Structural basis of viral invasion: Lessons from paramyxovirus F. *Curr Opin Struct Biol*. 17: 427-436.
 - Lamb RA and Parks GD. 2007. Paramyxoviridae: The viruses and their replication. *Fields Virology*, eds Knipe DM, Howley PM (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia), 5th Ed, 1: 1449-1496.
 - Laurie SA, Bell JC, Atkins HL, Roach J, Bamat MK, O'Neil JD, Roberts MS, Groene WS, Lorence RM. 2006. A phase 1 clinical study of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, using two-step desensitization. *Clinical Cancer Res*. 12 (8): 2555-2562.
 - Lee J-W, Huang JP, Hong LS, Shu SF, Yu CH, Chu CH. 2010. Prokaryotic Recombinant Hemagglutinin-Neuraminidase Protein Enhances the Humoral Response and Efficacy of Commercial Newcastle Disease Vaccines in Chickens. *Avian Dis*. 54, 53-58.
 - Lee YJ, Sung HW, Choi JG, Lee EK, Yoon H, Kim JH and Song CS. 2008. Protection of chickens from Newcastle disease with a recombinant baculovirus subunit vaccine expressing the fusion and hemagglutinin- neuraminidase proteins. *Science*. 9, 301-308.
 - Le Bayon JC, Lina B, Rosa-Calatrava M and Boivin G. 2012. Recent developments with liveattenuated recombinant paramyxovirus vaccines. *Reviews Med Virol*. 23 (1): 15-34.
 - Leelavathi S and Reddy VS. 2003. Chloroplast expression of His-tagged GUS-fusions: a general strategy to overproduce and purify foreign proteins using transplastomic plants as bioreactors. *Mol. Breed*. 11: 49–58.
 - Lehner D, Schlag P, Liebrich W, and Schirmacher V. 1990. Postoperative active specific immunization in curatively resected colorectal cancer patients with a virus-modified autologous tumor cell vaccine. *Cancer Immunol Immun*. 32 (3): 173-178.
 - Li M, Tang Z, Zhang Y, Lv S, Li Q, Chen X. 2015. Targeted delivery of cisplatin by LHRH-peptide conjugated dextran nanoparticles suppresses breast cancer growth and metastasis. *Acta Biomater*. 18: 132-143.

- Liang W, Wang H, Sun TM, Yao W Q, Chen LL, Jin Y, Li CL, Meng FJ. 2003. Application of autologous tumor cell vaccine and NDV vaccine in treatment of tumors of digestive traet. *World J Gastroentero.* 9 (3): 495-498.
- Liebrich W, Schlag P, Manasterski M, Lehner B, Stöhr, Möller P, Schirmacher V. 1991. In vitro and clinical characterisation of a Newcastle disease virus-modified autologous tumour cell vaccine for treatment of colorectal cancer patients. *Eur J Cancer.* 27 (6): 703-710.
- Lienard D, Sourrouille C, Gomord V, and Faye L. 2007. Pharming and transgenic plants, *Biotechnol Annu Rev.* 13:115-147.
- Lloyd R, Scott J, and Palmer EA. 2010. *Ep 1 620 550 b1 (12).* 1, 159-176.
- Lorence RM, Katubig BB, Reichard KW, Reyes HM, Phuangsab A, Sasseti MD, Walter RJ, Peeples ME.1994. "Complete regression of human fibrosarcoma xenografts after local Newcastle disease virus therapy," *Cancer Res.* 54 (23): 6017-6021.
- Lorence RM et al. 2011. Regression of human tumor xenografts following intravenous treatment using PV701, a naturally attenuated oncolytic strain of Newcastle disease virus in *Proceedings of the American Association for Cancer Research (AACR '01),* vol. 42, p. 454
- Lorence RM, Roberts MS, O'Neil JD, Groene WS, Miller JA, Mueller SN and Bamat MK. 2007. Phase 1 clinical experience using intravenous administration of PV701, an oncolytic Newcastle disease virus. *Current Cancer Drug Tar.* 7 (2): 157-167.
- Lowe SW and Lin AW. 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis.* 21: 485-95.
- Ma JK, Chikwamba R, Sparrow P, Fischer R, Mahoney R, and Twyman RM. 2005. Plant-derived pharmaceuticals – the road forward, *Trends Plant Sci.* 10: 580-585.
- Melanson VR and Iorio RM. 2004. Amino acid substitutions in the F-specific domain in the stalk of the Newcastle disease virus HN protein modulate fusion and interfere with its interaction with the F protein. *J Virol.* 78:13053-13061.
- Melanson VR and Iorio RM. 2006. Addition of N-glycans in the stalk of the Newcastle disease virus HN protein blocks its interaction with the F protein and prevents fusion. *J Virol.* 80: 623-633.
- Merino R, Villegas H, Quintana J, Calderon N. 2009. Characterization of Newcastle disease viruses isolated from chicken, gamefowl, pigeon and quail in Mexico. *Vet. Res. Commun.* 33, 1023-1130.

- Mett V, Farrance CE, Green BJ, and Yusibov V. 2008. Plants as biofactories, *Biologicals*. 36: 354-358.
- Mosmann, T. 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal Immunol Methods*. 65: 55-63.
- Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hugues MS, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, Topalian SL, Kammula US, Restifo NP, Zheng Z, Nahvi A, De Vries CR, Rogers-Freezer LJ, Mavroukakis SA and Rosenberg SA. 2006. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science*. 314: 126-129.
- Natilla A, Hammond RW and Nemchinov LG. 2006. Epitope presentation system based on cucumber mosaic virus coat protein expressed from a potato virus X-based vector. *Arch Virol*.151: 1373-1386.
- Nelson NJ.1999. Scientific interest in Newcastle disease virus is reviving. *J Natl Cancer Inst*. 91: 1708-10.
- Ni J, Galani IE, Cerwenka A, Schirmacher V and Fournier P. 2011. Antitumor vaccination by Newcastle Disease Virus Hemagglutinin–Neuraminidase plasmid DNA application: Changes in tumor microenvironment and activation of innate antitumor immunity. *Vaccine*. 29: 1185-1193.
- Ockert D, Schirmacher V, Beck N, Stoelben E, Ahlert T, Flechtenmacher J, Hagemüller E, Buchcik R, Nagel M and Saeger HD. 1996. Newcastle disease virus-infected intact autologous tumor cell vaccine for adjuvant active specific immunotherapy of resected colorectal carcinoma. *Clinical Can Res*. 2(1): 21-28.
- OIE, Organización Mundial de Salud Animal. 2014. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2014 http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.03.14_Enfermedad_Newcastle.pdf Ultima consulta junio del 2015.
- Ortega-Rivera OA, Quintanar JL, Del Toro-Arreola S, Alpuche-Solis AG, Esparza-Araiza MJ, Salinas E. 2017. Antitumor and immunostimulatory activities of a genotype V recombinant attenuated veterinary Newcastle disease virus vaccine. *Onco Letters*. 15(1): 1246-1254.
- Paul M and Ma JK-C. 2011. Plant-made pharmaceuticals: Leading products and production platforms. *IUBMB, Biotechnology Appl Bioc*. 58(1): 58-67.
- Pecora AL, Rizvi N and Cohen NI. 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 CL, Villegaz P and Calderon N. 2008. Biological and phylogenetic characterization of virulent Newcastle disease virus circulating in Mexico. *Avian Dis.* 52, 472-479.
- Peter ME and Krammer PH. 2003. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ.* 10: 26-35.
- Phuangsab A, Lorence RM, Reichard KW, Peeples ME, and Walter RJ. 2001. Newcastle disease virus therapy of human tumor xenografts: antitumor effects of local or systemic administration. *Cancer Lett.* 172 (1): 27-36.
- Pomer S, Thiele R, Staehler G, Drehmer I, Lohrke H, and Schirmacher V. 1995. Tumor vaccination with and without adjuvant interleukin 2 in renal cell carcinoma. A clinical contribution to the development of effective active specific immunization. *Urologe.* 34 (3): 215–220.
- Pulaski, BA and Ostrand-Rosenberg, S. 1998. Reduction of established spontaneous mammary carcinoma metastases following immunotherapy with major histocompatibility complex class II and B71 cell-based tumor vaccines. *Cancer Res.* 58: 1486-1493.
- Reed JC. 1999. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol*; 17: 2941-53.
- Reichard KW, Lorence RM, Cascino CJ, Peeples ME, Walter RJ, Fernando ME, Reyes HM and Greager MD. 1992. Newcastle disease virus selectively kills human tumor cells. *Journal Surg Res.* 52 (5): 448-453.
- Renzi F, Panetta G, Vallone B, Brunori M, Arceci M, Bozzoni I, Laneve P, Caffarelli E. 2006. Large-scale purification and crystallization of the endoribonuclease XendoU: troubleshooting with His-tagged proteins. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 62(Pt 3): 298-301.
- Robbins PF, Morgan RA, Feldman SA, Sherry RM, Dudley ME, Wunderlich JR, Nahvi AV, Helman LJ, Mackall CL, Kammula US, Hugues MS, Restifo NP, Rafferld M, Lee CC, Levy CL, Li YF, El-Gamil M, Schwarz SL, Laurencot C and Rosenberg SA. 2011. Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *J Clin Oncol.* 29: 917-924.
- Russell SJ, Peng KW and Bell JC. 2012. Oncolytic virotherapy, Review. *Nature Biotechnology.* 30(7): 1-13.
- Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR. 2008. Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections. In *Diseases of Poultry*, pp. 75–93, Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa, USA, 12th edition.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Sainsbury F, Thuenemann EC, Lomonosoff GP. 2009. pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant Biotechnol J.* 7(7): 682-693.
 - Schild H, von Hoegen P, and Schirmmayer V. 1989. Modification of tumor cells by a low dose of Newcastle disease virus. II. Augmented tumor-specific T cell response as a result of CD4+ and CD8+ immune T cell cooperation. *Cancer Immunol Immunoth.* 28 (1): 22-28.
 - Schlag P, Manasterski M, Gerneth T et al. 1992. Active specific immunotherapy with Newcastle-disease-virus-modified autologous tumor cells following resection of liver metastases in colorectal cancer. First evaluation of clinical response of a phase II-trial. *Cancer Immunol Immunoth.* 35 (5): 325-330.
 - Schirmmayer V. 2005. Anti-tumor immune memory and its activation for control of residual tumor cells and improvement of patient survival. in *Virus Therapy of Human Cancers*, J. Sinkovics and J. Horvath, Eds., Marcel Decker, New York, NY, USA, pp. 481-574.
 - Schirmmayer V, Griesbach A and Ahlert T. 2001. Antitumor effects of Newcastle Disease Virus in vivo: local versus systemic effects. *Int J Oncol;* 18(5): 945–952.
 - Schirmmayer V, Haas C, Bonifer R, Ahlert T, Gerhards R, and Ertel C. 1999. Human tumor cell modification by virus infection: an efficient and safe way to produce cancer vaccine with pleiotropic immune stimulatory properties when using Newcastle disease virus. *Gene Ther.* 6 (1): 63-73.
 - Schirmmayer V, Haas C, Bonifer R and Ertel C. 1997. Virus potentiation of tumor vaccine T-cell stimulatory capacity requires cell surface binding but not infection. *Clin Cancer Res.* 3: 1135-1148.
 - Schirmmayer V and Heicappell R. 1987. Prevention of metastatic spread by postoperative immunotherapy with virally modified autologous tumor cells. II. Establishment of specific systemic anti-tumor immunity. *Clinical Exp Metastas.* 5 (2): 147-156.
 - Schmittgen TD and Livak KJ. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc* 3: 1101-1108.
 - Seal BS. 2004. Nucleotide and predicted amino acid sequence analysis of the fusion protein and hemagglutinin-neuraminidase protein genes among Newcastle disease virus isolates. Phylogenetic relationships among the Paramyxovirinae based on attachment glycoprotein sequences. *Funct Integr Genomics.* 4: 246-257.

- Seal BS, Wise MG, Pedersen JC et al. 2005. Genomic sequences of low-virulence avian paramyxovirus-1 (Newcastle disease virus) isolates obtained from live-bird markets in North America not related to commonly utilized commercial vaccine strains. *Vet Microbiol.* 106(1-2): 7-16.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D and Lowe SW. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell.* 88: 593-602.
- Sinkovics JG and Horvath JC. 2000. Newcastle disease virus (NDV): brief history of its oncolytic strains. *J Clin Virol.* 16(1): 1-15.
- Sinkovics JG and Howe CD. 1969. Superinfection of tumors with viruses. *Experientia.* 25: 733-734.
- Smith EC, Popa A, Chang A, Masante C and Dutch RE. 2009. Viral entry mechanisms: The increasing diversity of paramyxovirus entry. *FEBS J.* 276: 7217-7227.
- Smyth MJ, Dunn GP and Schreiber RD. 2006. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv. Immunol.* 90: 1-50.
- Steiner HH, Bonsanto MM, Beckhove P et al. 2004. Antitumor vaccination of patients with glioblastoma multiforme: a pilot study to assess feasibility, safety, and clinical benefits. *Journal Clin Oncol.* 22 (21): 4272-4281.
- Stone-Hulslander J and Morrison TG. 1999. Mutational analysis of heptad repeats in the membrane-proximal region of Newcastle disease virus HN protein. *J Virol.* 73: 3630-3637.
- Sui H, Bai Y, Wang K, Li X, Song C, Fu F, Zhang Y and Li L. 2010. The anti-tumor effect of Newcastle disease virus HN protein is influenced by differential subcellular targeting. *Cancer Immunol Immunother.* 59: 989-999.
- Swann JB and Smyth MJ. 2007. Immune surveillance of tumors. *J. Clin. Investig.* 117: 1137-1146.
- Takimoto T, Taylor GL, Crennell SJ, Scroggs RA and Portner A. 2000. Crystallization of Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein. *Virology.* 270: 208-214.
- Toyoda T, Gotoh B, Sakaguchi T, Kida H and Nagai Y. 1988. Identification of amino acids relevant to three antigenic determinants on the fusion protein of Newcastle disease virus that are involved in fusion inhibition and neutralization. *J. Virol.* 62: 4427-4430.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Umansky V, Shatrov VA, Lehmann V, and Schirrmacher V. 1996. Induction of NO synthesis in macrophages by Newcastle disease virus is associated with activation of nuclear factor- κ B. *Int Immunol.* 8(4): 491-498.
 - United States Department of Agriculture, USDA. 2006. <http://www.aphis.usda.gov> Última consulta 20/06/2012.
 - United States Department of Agriculture, USDA. 2006. <http://www.aphis.usda.gov/newsroom/content/2006/01/ndvaccine.shtml> Última consulta junio del 2015.
 - Valdez-Ortiz A, Rascón-Cruz Q, Medina-Godoy S, Sinagawa-García SR, Valverde-González ME, Paredes-López O. 2005. One-step purification and structural characterization of a recombinant His-tag 11S globulin expressed in transgenic tobacco. *J Biotechnol.* 23; 115(4): 413-423.
 - Vardakou M, Sainsbury F, Rigby N, Mulholland F, Lomonosoff GP. Expression of active recombinant human gastric lipase in *Nicotiana benthamiana* using the CPMV-HT transient expression system. 2012. *Protein Expr Purif.* 81(1): 69-74.
 - Vigil A, Park MS, Martínez O et al. 2007. Use of reverse genetics to enhance the oncolytic properties of newcastle disease virus. *Cancer Res.* 67(17): 8285-8292.
 - Von Hoegen P, Zawatzky R, and Schirrmacher V. 1990. Modification of tumor cells by a low dose of Newcastle disease virus. III. Potentiation of tumor specific cytolytic T cell activity via induction of interferon- α/β . *Cellular Immunol.* 126(1): 80-90.
 - Washburn B, Weigand MA, Grosse-Wilde A et al. 2003. "TNF-related apoptosis-inducing ligand mediates tumoricidal activity of human monocytes stimulated by newcastle disease virus," *J Immunol.* 170(4): 1814-1821.
 - Woestenenk EA, Hammarström M, van den Berg S, Härd T, Berglund H. 2004. His tag effect on solubility of human proteins produced in *Escherichia coli*: a comparison between four expression vectors. *J Struct Funct Genomics.* 5(3): 217-229.
 - World Health Organization (WHO) www.who.int/ Accesado por ultima vez en abril 2017.
 - Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, et al. 2007. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 445: 656-660.

- Yang JC, Haworth L, Sherry RM, et al. 2003. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med*; 349: 427-434.
- Yang ZQ, Liu QQ, Pan ZM et al. 2007. Expression of the fusion glycoprotein of Newcastle disease virus in transgenic rice and its immunogenicity in mice. *Vaccine* 25: 591–598.
- Yuan P, Swanson KA, Leser GP, Paterson RG, Lamb RA, and Jardetzky TS. 2011. Structure of the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase (HN) ectodomain reveals a four-helix bundle stalk. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108(36): 14920-14925.
- Zamarin D, Martinez-Sobrido L, Kelly K et al. 2009. Enhancement of oncolytic properties of recombinant newcastle disease virus through antagonism of cellular innate immune responses. *Mol Ther*. 17: 697-706.
- Zanetti F, Berinstein A, Carrillo E. 2008. Effect of host selective pressure on Newcastle disease virus virulence,” *Microbial Path*. 44 (2): 135-140.
- Zeng J, Fournier P and Schirmacher V. 2002. Induction of interferon- alpha and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in human blood mononuclear cells by hemagglutininneuraminidase but not F protein of Newcastle disease virus. *Virology* 297: 19-30.
- Zhao Y and Hammond RW. 2005. Development of a candidate vaccine for Newcastle disease virus by epitope display in the cucumber mosaic virus capsid protein. *Biotechnol Lett*. 27: 375-382.
- Zhao H and Peeters BPH. 2003. Recombinant Newcastle disease virus as a viral vector: effect of genomic location of foreign gene on gene expression and virus replication. *J Gen Virol*. 84(4): 781-788.
- Zitvogel L, Tesniere A and Kroemer G. 2006. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat. Rev. Immunol*. 6: 715-727.
- Zoth SC, Go E, Carballeda JM and Taboga O. 2009. Potential Use of the Hemagglutinin-Neuraminidase Glycoprotein of Newcastle Disease Virus Expressed in *Rachiplusia nu* Larvae as an Immunogen for Chicken. 16, 775-778.
- Zoth SC, Gómez E, Manuel J, Carrillo E and Berinstein A. 2011. Journal of Veterinary Diagnostic a diagnostic reagent.

GLOSARIO.

Activación de macrófagos. Los macrófagos en reposo no destruyen ciertas bacterias intracelulares a menos que sean activadas por células T. La activación de macrófagos es importante para controlar la infección y puede dañar los tejidos vecinos.

Adyuvante. Se aplica a cualquier sustancia que aumenta la respuesta inmunitaria contra un antígeno con el que está mezclada.

Adenocarcinoma. Tumor maligno que se origina en el tejido glandular. Se trata de la variedad más frecuente de cáncer, entre los que destacan casi todos los que se derivan del árbol respiratorio, el tubo digestivo, las mamas, el colon o la próstata.

ADN Siglas de ácido desoxirribonucleico. Molécula que se localiza en el núcleo de las células y que mantiene la información genética sobre el crecimiento, la división y la función de las células. Conocido también como DNA (Deoxyribonucleic Acid) por sus siglas en inglés.

Afinidad. Es la fuerza de unión de una molécula a otra en una única localización, como por ejemplo la unión de un fragmento de anticuerpo Fab monovalente a un antígeno monovalente. Ver también Avidéz.

Aglutinación. Consiste en el agrupamiento de partículas entre sí, habitualmente por moléculas de anticuerpo que se unen a los antígenos presentes en la superficie de las partículas adyacentes. Se dice que tales partículas se aglutinan. Cuando las partículas son eritrocitos, el fenómeno se denomina "hemaglutinación".

Alogénicos. Se dice de un individuo o de una cepa de ratones con respecto a otro individuo o cepa que difieren en el MHC. El término se puede usar también para diferencias alélicas en otros loci.

Anergia. Es un estado de ausencia de respuesta al antígeno. Se dice que un individuo es anérgico para un antígeno en particular cuando no desarrolla respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado frente a la inoculación dérmica del antígeno. Se considera que las células T y B son anérgicas cuando no pueden responder a su antígeno específico bajo condiciones óptimas de estimulación.

Angiogénesis. Proceso fisiológico que consiste en la formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de los vasos preexistentes. Es un fenómeno normal durante el desarrollo embrionario, el crecimiento del organismo y en la cicatrización de las

heridas. Sin embargo también en un proceso fundamental en la transformación maligna del crecimiento tumoral.

Antiangiogénesis. Novedosa terapia contra el cáncer basada en el empleo de sustancias que impiden o dificultan el suministro de sangre que alimenta al tumor deteniendo su crecimiento

Antimitótico. Fármaco que impide la división y crecimiento de células.

Antineoplásico. Fármaco que inhibe o previene el desarrollo del cáncer porque evita el crecimiento de las células tumorales.

Antiapoptótico. Sustancia o mecanismo que contrarresta la apoptosis y favorece la aparición y progresión del cáncer. Muchos de los genes que participan en la génesis del cáncer son antiapoptóticos.

Anticuerpo. Es una glicoproteína que se une específicamente a una sustancia particular, que constituye su antígeno. Cada molécula de anticuerpo presenta una estructura única que le permite unirse de forma específica a su antígeno correspondiente, pero todos los anticuerpos poseen la misma estructura general con una unidad básica que consiste en dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas y se conocen colectivamente como inmunoglobulinas. Los anticuerpos son producidos por las células plasmáticas en respuesta a una infección o inmunización, y unen y neutralizan patógenos o los preparan para su destrucción por los fagocitos.

Anticuerpos antiinmunoglobulinas. Anticuerpos contra los dominios constantes de las inmunoglobulinas, útiles para detectar moléculas de anticuerpo unidas en inmunoensayos y otras aplicaciones.

Anticuerpos monoclonales. Anticuerpos generados por una sola clona de linfocitos B. Generalmente se producen a partir de células híbridas productoras de anticuerpo, procedentes de una fusión entre células de mieloma y las células de bazo de un animal (habitualmente un ratón) inmunizado.

Antígeno. Se refiere a cualquier molécula que puede unirse específicamente a un anticuerpo o receptor de célula T. Su nombre procede de su capacidad de generar anticuerpos. Sin embargo, algunos antígenos no generan anticuerpos por sí mismos; aquellos que pueden inducir su producción se denominan inmunógenos

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Antisuero. Es el componente fluido de la sangre coagulada de un individuo inmune que contiene anticuerpos contra la molécula empleada para la inmunización. Los antisueros contienen colecciones heterogéneas de anticuerpos; todos ellos se unen al antígeno empleado para la inmunización, pero cada uno posee su propia estructura, su propio epítopo al que reconocen específicamente el antígeno y su propio conjunto de reacciones cruzadas. Esta heterogeneidad hace que cada antisuero sea único.

Apoptosis. También llamada muerte celular programada, es una forma de muerte celular en que la célula activa un programa interno de muerte. Se caracteriza por degradación del ADN nuclear, degeneración y condensación nuclear y fagocitosis de residuos celulares. Las células en proliferación experimentan apoptosis con frecuencia, lo cual constituye un proceso natural en el desarrollo, y los linfocitos en proliferación presentan altas tasas de apoptosis durante el desarrollo y las respuestas inmunitarias. Contrasta con la necrosis, que se produce en situaciones tales como envenenamiento o anoxia.

ARN Siglas de ácido ribonucleico. Ácido nucleico presente en todas las células que transmite mensajes genéticos entre las estructuras de la célula. Usualmente se conoce como ARN o RNA (éstas últimas con sus siglas en inglés Ribonucleic acid).

ARN mensajero. Ácido ribonucleico que contiene la información genética procedente del ADN para la síntesis de proteínas, es decir, determina el orden en que se unirán los aminoácidos. Generalmente se representa con las siglas ARNm.

Atenuados. Se dice de aquellos gérmenes patógenos capaces de crecer en su huésped e inducir inmunidad sin provocar enfermedad clínica grave.

B7.1 (CD 80) y B7.2 (CD 86). Son las principales moléculas coestimuladoras de las células T; se trata de miembros estrechamente relacionados pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Se expresan de forma diferencial en varios tipos de células presentadoras de antígeno, y pueden conllevar diferentes consecuencias para las células T que responden frente al antígeno. El término moléculas B7 se refiere tanto a B7.1 como a B7.2.

Bazo. Órgano formado por pulpa roja, que interviene en la eliminación de hematíes viejos, y por pulpa blanca formada por células linfoides, que responden a los antígenos que llegan al bazo a través de la sangre.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Cáncer. Conjunto de síntomas de pronóstico y tratamiento diferentes, que se caracteriza por la proliferación acelerada, desordenada y descontrolada de las células de un tejido que invaden, desplazan y destruyen, localmente y a distancia, otros tejidos sanos del organismo.

Carcinogénesis. Origen y formación de un tumor canceroso, a través de la proliferación incontrolada de células

Carcinógeno. Dicho de una sustancia o agente que produce cáncer.

Carcinoma. Tumor maligno derivado de estructuras epiteliales o glandulares; constituyen el tipo más común de cáncer. Lugares comunes de carcinomas son la piel, la boca, el pulmón, las mamas, el estómago, el colon y el útero. Los dos grandes grupos de esta variedad de tumor son los carcinomas epidermoides y los adenocarcinomas.

Cadena ligera o liviana (L). Es la más pequeña de las cadenas polipeptídicas que conforman las inmunoglobulinas (25 kDa). Está formada por un dominio V y un dominio C, y se une a la cadena pesada mediante un puente disulfuro.

Cadena pesada (H). Es uno de los dos tipos de cadena que poseen todas las inmunoglobulinas. La cadena pesada tiene entre 50 y 70 kDa. Las cadenas pesadas presentan diversas clases o isotipos, cada uno de los cuales confiere una actividad funcional característica a la molécula de anticuerpo.

CD - grupos de diferenciación (clusters of differentiation). Se trata de grupos de anticuerpos monoclonales que identifican la misma molécula de la superficie celular. La molécula de la superficie celular se designa mediante las letras CD seguidas de un número (ej., CD1, CD2, etc.).

CD4. Es una proteína de superficie celular, importante para el reconocimiento por el receptor de células T de péptidos antigénicos unidos a moléculas de MHC de clase II. Actúa como correceptor, uniéndose a la cara lateral de las moléculas de MHC de clase II.

CD8. Esta proteína de superficie celular es importante para el reconocimiento por parte del receptor de las células T de péptidos antigénicos unidos a moléculas MHC de clase I. Actúa como correceptor por su unión a la cara lateral de moléculas de MHC de clase I.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Célula. Unidad estructural y funcional de los organismos vivos, generalmente de tamaño microscópico, capaz de reproducción independiente y formada por un citoplasma y un núcleo rodeados por una membrana (en los eucariontes). Esta unidad es capaz de vivir como organismo unicelular independientemente, o bien, formar parte de una organización mayor, como un organismo pluricelular. Se cree que el cáncer se origina a partir de la transformación maligna de una única célula.

Célula B o linfocito B. Es uno de los dos tipos principales de linfocitos. El receptor de antígeno de los linfocitos B, denominado a veces receptor de la célula B, es una inmunoglobulina presente en la superficie celular. Al ser activadas por el antígeno, las células B se diferencian a células plasmáticas que secretan moléculas de anticuerpo con la misma especificidad por el antígeno que la que expresaban en la membrana como receptor del antígeno.

Células accesorias. En la inmunidad adaptativa, se trata de células que ayudan a la respuesta pero que no intervienen en el reconocimiento específico del antígeno. Incluyen fagocitos, mastocitos y células NK, y se denominan también células accesorias efectoras.

Células asesinas naturales (células NK o natural killers). Son linfocitos no T, no B de apariencia grande y habitualmente con granulación azurófila citoplasmática, que pertenecen a las células linfoides innatas de tipo I citotóxicas; su acción consiste en lisar o inducir apoptosis de ciertas células tumorales. Las células NK son importantes en la inmunidad innata contra los virus y otros patógenos intracelulares, así como en la citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpos (ADCC).

Células dendríticas. También conocidas como células reticulares interdigitantes, se encuentran en las áreas de células T de los tejidos linfoides. Presentan una morfología ramificada o dendrítica, y son las principales estimuladoras de las respuestas de células T. Los tejidos no linfoides contienen también células dendríticas, pero éstas no parecen estimular las respuestas de células T hasta que se activan y migran hacia los tejidos linfoides. Las células dendríticas derivan de precursores hematopoyéticos. Son distintas de las células dendríticas foliculares que presentan el antígeno a las células B.

Células dendríticas foliculares. Son células de los folículos linfoides de origen incierto, que establecen estrecho contacto con numerosas células B. Poseen receptores Fc y receptores para proteínas del complemento que no son internalizados por endocitosis

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

mediada por receptor y a través de ellos mantienen los complejos antígeno-anticuerpo en la superficie de sus largas ramificaciones. Estas células son cruciales para la selección de células B específicas del antígeno durante las respuestas de anticuerpos en los centros germinativos.

Células diana o blanco. Son aquellas que expresan los antígenos que activan las funciones efectoras de las células T; dichas funciones se miden analizando los efectos que ejercen sobre las células diana. Pueden ser células B (que se activan para producir anticuerpos), macrófagos (que se activan para matar bacterias o células tumorales) o células radiomarcadas (que son lisadas *in vitro* por células T citotóxicas).

Células efectoras. Se trata de linfocitos que pueden mediar la eliminación de gérmenes patógenos sin necesidad de mayor diferenciación, al contrario de los linfocitos naive (que deben proliferar y diferenciarse antes de poder mediar funciones efectoras) y de las células memoria (que deben diferenciarse y a menudo proliferar antes de convertirse en células efectoras).

Células mononucleares de sangre periférica. Se trata de linfocitos y monocitos aislados de sangre periférica, habitualmente por centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll Hypaque.

Células plasmáticas o plasmocitos. Son linfocitos B en su estadio terminal de diferenciación. Constituyen las principales células secretoras de anticuerpo. Se encuentran en la médula de los ganglios linfoides, en la pulpa roja del bazo y en la médula ósea.

Células presentadoras de antígeno. Son células altamente especializadas que pueden procesar antígenos y mostrar sus fragmentos peptídicos en la superficie celular junto con moléculas necesarias para la activación de los linfocitos T. Las principales células presentadoras de antígeno para las células T son las células dendríticas, los macrófagos.

Células presentadoras de antígeno profesionales (APC -del idioma Inglés-). Son las células que inician las respuestas al antígeno de las células T naive. Hasta la fecha, sólo las células dendríticas, los macrófagos y las células B han demostrado poseer tal capacidad. Una célula presentadora de antígeno profesional debe ser capaz de presentar fragmentos peptídicos de antígeno en las moléculas de MHC apropiadas, así como expresar moléculas coestimuladoras en su superficie.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Células T CD4 cooperadoras. Se trata de células T CD4 que pueden ayudar a las células B a generar anticuerpos en respuesta a un estímulo antigénico, a las propias células T a activarse o inhibirse y también intervienen en la activación y regulación de las células inflamatorias. Algunos expertos consideran como células cooperadoras todas las células T CD4, independientemente de su función.

Células T citotóxicas. Son células T que destruyen otras células. La mayoría de las células T citotóxicas son células T CD8+ restringidas por MHC de clase I, pero las células T CD4 también pueden ser citotóxicas en algunos casos. Las células T citotóxicas son importantes para la defensa del huésped contra gérmenes patógenos de crecimiento intracelular.

Células T efectoras. Se denominan así las células T efectoras activadas, ya que realizan sus funciones efectoras inmediatamente después de contactar con células que portan el complejo péptido-MHC para el cual son específicas. Contrastan con las células T memoria, que necesitan ser activadas por las células presentadoras de antígeno a fin de mediar respuestas efectoras.

Células T o linfocitos T. Subpoblación de linfocitos definida por su desarrollo en el timo y por sus receptores de antígeno heterodiméricos, asociados con el complejo CD3. La mayoría de las células T presentan receptores heterodiméricos $\alpha\beta$, pero existe una pequeña proporción con receptores heterodiméricos $\gamma\delta$.

Células TH1. Subpoblación de células T CD4 caracterizada por las citocinas que produce. Intervienen principalmente en la activación de macrófagos, y a veces se denominan células T CD4 inflamatorias.

Células TH2. Subpoblación de células T CD4 caracterizada por el patrón de citocinas que produce. Intervienen principalmente en la estimulación de células B para la producción de anticuerpos. A menudo se denominan células T CD4 cooperadoras.

Células TH3. Este término se emplea para describir aquellas células que producen fundamentalmente factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) en respuesta al antígeno. Se desarrollan de forma predominante en la respuesta inmunitaria de la mucosa contra antígenos presentados oralmente.

Células T supresoras. Se trata de células T que suprimen su actividad cuando se mezclan con células T naive o efectoras. La naturaleza precisa de estas células y sus medios de reconocimiento antigénico y activación están siendo establecidos.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Citocinas. Son proteínas de bajo peso molecular producidas por células que afectan al comportamiento de otras células. Las citocinas producidas por linfocitos se denominan comúnmente linfocinas o interleucinas (IL), pero el término genérico citocina se emplea en la mayor parte de la literatura. Las citocinas actúan sobre receptores específicos en las células a las que afectan.

Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC -siglas del idioma Inglés-). Se trata de la lisis de células blanco cubiertas de anticuerpos por células con receptores Fc que reconocen la región Fc del anticuerpo unido a las células diana. La mayor parte de la ADCC es mediada por células NK que poseen el receptor FcγRIII o CD16 en su superficie.

Citotoxinas. Son proteínas producidas por células T citotóxicas que participan en la destrucción de las células diana. Las perforinas y las granzimas o fragmentinas son las principales citotoxinas que se conocen.

Clona o clon. Población de células derivadas de una única célula progenitora.

Código genético. Clave de la información contenida en los genes que expresa la correspondencia universal entre la secuencia de los ácidos nucleicos y la de las proteínas y constituye el fundamento de la transmisión de los caracteres hereditarios.

Complejo principal de histocompatibilidad (MHC, Major Histocompatibility Complex). Grupo o conjunto de genes localizado en el cromosoma 6 humano y 17 murino, que codifica un grupo de glucoproteínas de membrana denominadas moléculas MHC. Las moléculas MHC de clase I presentan péptidos, generados en el citosol, a células T CD8; las moléculas MHC de clase II presentan péptidos degradados en vesículas intracelulares, a células T CD4. El MHC también codifica proteínas que intervienen en el procesamiento de antígeno y otros aspectos de la defensa del huésped. El MHC es el grupo génico más polimórfico del genoma humano, con gran número de alelos en diferentes loci. Puesto que dicho polimorfismo suele detectarse mediante anticuerpos o células T específicas, por lo general las moléculas de MHC se denominan antígenos principales de histocompatibilidad.

Diferenciación. Proceso por el que las células adquieren una forma y una función determinada durante el desarrollo embrionario o la vida de un organismo pluricelular, especializándose en un tipo celular. La diferenciación suele estar en relación inversa con la capacidad de proliferación de las células, por lo que las cancerosas sufren un proceso de desdiferenciación.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Displasia. Proliferación anómala de células, caracterizada por la pérdida en el arreglo del tejido normal y la estructura de la célula. Estas células con frecuencia regresan a su estado normal, pero en ocasiones gradualmente se convierten en malignas.

ELISA (enzyme linked immunosorbent assay -ensayo inmunoabsorbente conjugado a enzimas). Ensayo serológico en que la unión del antígeno o del anticuerpo se detecta porque éstos se hallan conjugados a una enzima que, al actuar sobre un sustrato incoloro, da origen a una reacción coloreada. Este ensayo es ampliamente utilizado en biología y medicina, así como en inmunología.

Envoltura vírica. Estructura que envuelve numerosos virus producidos por células de mamíferos; está compuesta por lípidos y proteínas de la membrana celular del huésped unidos al núcleo vírico por proteínas de la envoltura.

Ensayo clínico. Estudio en el que se investiga una pregunta importante en medicina para aumentar el conocimiento. La mayoría de los estudios que se llevan a cabo, evalúan nuevos fármacos o tratamientos médicos con un protocolo de investigación estrictamente controlado.

Ensayo clínico fase I. Primeros estudios que se realizan en seres humanos, que pretenden demostrar la seguridad de un fármaco o tratamiento y orientar hacia la pauta de administración más adecuada para estudios posteriores.

Ensayo clínico fase II. Estudio que tiene como objetivo proporcionar información preliminar sobre la eficacia del producto y establecer la relación dosis/ respuesta; son estudios terapéuticos exploratorios.

Ensayo clínico fase III. Estudio que evalúa la eficacia y seguridad del tratamiento experimental en las condiciones de uso habituales y con respecto a las alternativas terapéuticas disponibles para la indicación estudiada. Se trata de estudios terapéuticos de confirmación.

Enzima. Proteína compleja que produce un cambio químico específico sobre otras sustancias sin que exista un cambio sobre sí mismas.

Epitopo o epitope. Es una zona situada en la superficie de la molécula de un antígeno reconocida por un anticuerpo; los epitopos se denominan también determinantes antigénicos. Un epitopo de célula T es un péptido corto derivado de un antígeno proteico. Se une a una molécula MHC y es reconocido por una célula T determinada.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Factor estimulador de colonias. Proteína, variedad de factores de crecimiento, que promueve el crecimiento y la división de las células productoras de sangre en la médula ósea. Los factores estimuladores de colonia son producidos de forma natural en el cuerpo. Sin embargo, se pueden administrar cantidades adicionales como tratamiento para reducir o prevenir ciertos efectos secundarios de la quimioterapia debido a la falta de células sanguíneas.

Factor de necrosis tumoral- α (TNF- α). Se trata de una citocina producida por los macrófagos, mastocitos y las células T. Desempeña múltiples funciones en la respuesta inmunitaria. Es el miembro que define la familia TNF de citocinas. Estas citocinas funcionan como proteínas asociadas a las células o secretadas que interactúan con los receptores de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR); éste a su vez se comunica con el interior de la célula mediante componentes conocidos como TRAF (factores asociados al receptor del factor de necrosis tumoral).

Fagocitosis. Consiste en la internalización de materia particulada por las células. Habitualmente, las células fagocíticas o fagocitos son macrófagos o neutrófilos y las partículas son bacterias capturadas y destruidas. El material ingerido está contenido en una vesícula denominada fagosoma, que se fusiona con uno o más lisosomas para formar el fagolisosoma. Las enzimas lisosomales son importantes en la destrucción del patógeno y en su degradación a partículas pequeñas.

Gen. Secuencia de ADN que constituye la unidad funcional para la transmisión de los caracteres hereditarios.

Gen supresor de tumores. Sustancia de ADN que reduce la probabilidad de que una célula en un organismo multicelular se transforme en una célula cancerígena. Las mutaciones en los genes supresores de tumores activan la división celular y la formación de tumores. Así, un gen supresor tumoral alterado es similar a un oncogén. También se conoce como antioncogén.

Genoma. Conjunto de los genes de un individuo o de una especie, contenido en un juego haploide de cromosomas; esto es, todo el material genético contenido en las células de un organismo en particular

GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos). Citocina con función de factor de crecimiento que estimula la división y proliferación de los neutrófilos. Su variedad sintética se emplea para prevenir o contrarrestar la neutropenia ocasionada por la quimioterapia.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Granulocitos. Células de la sangre caracterizadas por los modos de colorear los orgánulos de su citoplasma, en microscopía de luz. También se les conoce como leucocitos polimorfonucleares, debido a las formas variables de núcleo que pueden presentar. Su núcleo suele estar lobulado en varios segmentos.

Granzimas o Fragmentinas. Son esterasas de serina presentes en los gránulos de linfocitos citotóxicos, principalmente de los linfocitos T citotóxicos y de las células NK. Cuando las fragmentinas penetran en el citosol de otras células inducen apoptosis, con fragmentación del ADN nuclear en multímeros de 200 pares de bases; de ahí procede su nombre.

Hepatoblastoma. Tumor maligno muy raro que se origina en el hígado. La enfermedad afecta principalmente a los niños desde la infancia hasta los 5 años de edad.

HER2/neu. Oncogén que produce una proteína que constituye un receptor en la membrana de la célula, al que se unen sustancias que favorecen el crecimiento de la célula (factor de crecimiento). Se da en ciertos cánceres de mama que pueden ser tratados con anticuerpos monoclonales dirigidos contra esa proteína.

Hipersensibilidad de tipo retardado. Se trata de una forma de inmunidad inducida por antígenos presentes en la piel y mediada por células CD4 TH1. Se denomina hipersensibilidad de tipo retardado porque la reacción aparece horas o días después de inyectarse el antígeno.

Histocompatibilidad. Consiste literalmente en la capacidad de los tejidos (del griego histo) para permanecer unidos unos a otros. Se emplea en inmunología para describir los sistemas genéticos que determinan el rechazo de los trasplantes de tejidos y órganos, que es resultado del reconocimiento inmunológico de los antígenos de histocompatibilidad.

HLA (Human Leukocyte Antigen -Antígeno Leucocitario Humano-). Se trata de la designación genética del MHC humano. Los loci individuales se designan con letras mayúsculas (p. ej., HLA-A), y los alelos con números (p. ej., HLA- A.0201).

Inflamación. Consiste en la acumulación local de líquido, proteínas del plasma y células blancas de la sangre; se inicia por daño físico, infección o respuesta inmunitaria local. También se conoce como respuesta inflamatoria. Inflamación aguda es el término utilizado para describir episodios tempranos y a menudo transitorios, mientras que la inflamación crónica se produce cuando la infección persiste o durante

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

las respuestas inmunitarias. Existen muchas formas diferentes de inflamación en diferentes enfermedades. Las células que invaden los tejidos y que están llevando a cabo respuestas inflamatorias suelen denominarse células inflamatorias o infiltrado inflamatorio.

Inmunidad. Es la capacidad de resistir a la infección.

Inmunidad adoptiva o transferencia adoptiva o inmunización adoptiva. Es la inmunidad conferida a un receptor naive o irradiado mediante transferencia de células linfoides de un donante activamente inmunizado.

Inmunidad humoral. Es sinónimo de respuesta de anticuerpos específicos, también llamada respuesta inmunitaria humoral. La inmunidad humoral puede transferirse a los receptores no inmunizados empleando un suero inmunitario que contenga anticuerpos específicos.

Inmunidad innata. Es aquella de la cual dependen las fases tempranas de la respuesta del huésped a la enfermedad. En este tipo de inmunidad, diversos mecanismos de resistencia innata reconocen el patógeno y responden a su presencia. La inmunidad innata está presente en todos los individuos en todo momento, no aumenta con exposiciones repetidas a un patógeno dado y no discrimina entre patógenos.

Inmunidad mediada por células o respuesta inmunitaria mediada por células. Designa cualquier respuesta inmunitaria adaptativa en la cual las células T específicas de antígeno desempeñan el papel principal.

Inmunidad protectora. Consiste en la resistencia a una infección específica que sigue a la infección o a la vacunación.

Inmunización. Es la estimulación deliberada de una respuesta inmunitaria adaptativa mediante la introducción de un antígeno en el organismo.

Inmunización activa. Se trata de la inmunización con un antígeno. Se distingue de la transferencia de anticuerpos a un individuo no inmunizado o inmunización pasiva.

Inmunización pasiva. Consiste en la inyección de anticuerpo o suero inmunitario en un receptor no inmunizado.

Inmunología celular. Consiste en el estudio de las bases celulares de la inmunidad.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Inmunorregulación. Es la capacidad del sistema para captar y regular sus propias respuestas.

Inmunotoxinas. Son anticuerpos acoplados químicamente a proteínas tóxicas, a menudo derivadas de plantas y microbios. Los anticuerpos dirigen las toxinas a las células requeridas. Las inmunotoxinas se están poniendo a prueba como agentes anticancerígenos y fármacos inmunosupresores.

Inmunoterapia. Tratamiento que se basa en la estimulación del propio sistema inmunológico del paciente para que sea capaz de reconocer y eliminar las células tumorales.

Interacción primaria. Designa la unión de una molécula de anticuerpo con su antígeno. Es distinta de las interacciones secundarias, en las que la unión se detecta por algún cambio asociado como la precipitación de antígeno soluble o la aglutinación de antígeno en partículas.

Interferones. Son citocinas que pueden inducir a las células a resistir la replicación vírica. El interferón (IFN)- α y el IFN- β son producidos por leucocitos y fibroblastos respectivamente, al igual que por otras células, mientras que el IFN- γ es un producto de las células CD4 TH1, T CD8 y NK. El IFN- γ tiene como función primaria la activación de los macrófagos.

Interleucina. Abreviada IL, es un término genérico para las citocinas producidas por los leucocitos.

Leucemia. Grupo de enfermedades de la médula ósea que implican un aumento incontrolado de glóbulos blancos (leucocitos), pero también puede afectar a los glóbulos rojos y a las plaquetas. Suele surgir de la médula ósea, pero, a diferencia de los linfomas, no tiende a formar masas sólidas, sino un aumento muy acusado del número de células sanguíneas. Existen muchos tipos de leucemias.-

Leucocito. Término general para designar las células blancas de la sangre. Los leucocitos incluyen los linfocitos, leucocitos polimorfonucleares y monocitos.

Leucocitos polimorfonucleares. Son leucocitos con núcleos multilobulados y gránulos citoplasmáticos. Existen tres tipos: los neutrófilos con gránulos que se tiñen con colorantes neutros, los eosinófilos con gránulos que se tiñen con eosina y los basófilos con gránulos que se tiñen con colorantes básicos.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Leucocitosis. Aumento del número de leucocitos en la sangre comúnmente observado en infecciones agudas.

Leucopenia. Disminución del número de leucocitos totales por debajo de 4.000 - 4.500 /mm cúbicos, con frecuencia como efecto secundario de la quimioterapia.

Ligando de CD40 (CD40L o CD154). Se trata de una molécula expresada en la membrana de las células T cooperadoras activadas, que mediante su interacción con CD40 expresada en la superficie de las células B, es importante para promover la proliferación de estas últimas.

Linfocitos. Constituyen un tipo de leucocitos, y son responsables de todas las respuestas inmunitarias adaptativas. Expresan receptores del antígeno codificados por segmentos génicos reordenados. Existen dos clases principales de linfocitos: los linfocitos B (células B) y los linfocitos T (células T), que median respectivamente la inmunidad humoral y la inmunidad mediada por células. Los linfocitos en reposo son células pequeñas que presentan citoplasma escaso y cromatina nuclear condensada. Después del reconocimiento del antígeno, se activan y muestran un tamaño celular incrementado, constituyendo lo que se denomina un linfoblasto; éste a su vez prolifera y se diferencia a célula efectora específica del antígeno.

Linfocitos naive. Son linfocitos que nunca se han encontrado con su antígeno específico y por tanto nunca han respondido contra él, a diferencia de los linfocitos memoria o efectores. Todos los linfocitos que abandonan los órganos linfoides centrales son linfocitos naive; los del timo se conocen como células T naive y los de la médula ósea como células B naive.

Macrófagos. Son grandes células fagocíticas mononucleadas que se hallan en los distintos territorios tisulares del organismo. Son importantes en las fases tempranas de inmunidad innata como células presentadoras del antígeno, y como células efectoras en la respuesta inmunitaria adaptativa humoral y mediada por células. Se trata de células migratorias que derivan de precursores de la médula ósea, encontrándose en la mayoría de los tejidos del cuerpo. Desempeñan un papel crucial en la defensa del huésped.

Maligno. Dicho de una lesión o de una enfermedad, y especialmente de un tumor canceroso. Que evoluciona de modo desfavorable.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Marcador tumoral. Sustancias que a menudo pueden descubrirse en cantidades mayores que las normales en la sangre, orina, o tejidos del cuerpo de algunos pacientes con ciertos tipos de cáncer. Los marcadores tumorales son producidos por el propio tumor o por el cuerpo como respuesta a la presencia de cáncer o ciertas condiciones benignas (no cancerosas). Además del papel que desempeñan en el diagnóstico de cáncer, los niveles de algunos marcadores tumorales son medidos antes del tratamiento para ayudar a los médicos a programar la terapia apropiada. En algunos tipos de cáncer, los niveles del marcador tumoral reflejan la extensión de la enfermedad y pueden ser útiles al predecir qué tan bien responderá la enfermedad al tratamiento. Los niveles del marcador tumoral también pueden medirse durante el tratamiento para supervisar la respuesta del paciente al tratamiento.

Melanoma. Nombre genérico de los tumores melánicos o pigmentados. Generalmente, se trata de un tumor cutáneo y altamente invasivo por su capacidad de generar metástasis.

Metástasis. Diseminación a órganos distantes de una infección o de un tumor primario maligno o cáncer, que ocurre generalmente por vía sanguínea o linfática. En muchos casos, la existencia de metástasis establece el límite entre lo que es curable y lo que no. Sin embargo, hay tipos de cáncer que resultan curables incluso con metástasis muy extensas.

Monocitos. Leucocitos de núcleo reniforme; son los precursores de los macrófagos.

Mutación. Alteración o cambio en la información genética (genotipo) de un ser vivo y que, por lo tanto, va a producir un cambio de características, que se presenta súbita y espontáneamente, y que se puede transmitir o heredar a la descendencia. La unidad genética capaz de mutar es el gen, que es la unidad de información hereditaria que forma parte del ADN. En los seres multicelulares, las mutaciones sólo pueden ser heredadas cuando afectan a las células reproductivas. Las células cancerosas contienen numerosas alteraciones.

Necrosis. Consiste en la muerte de las células o los tejidos debido a daño químico o físico, en oposición a la apoptosis que constituye una forma programada biológicamente de muerte celular. La necrosis deja muchos desechos celulares que deben ser eliminados por los fagocitos, lo cual no ocurre en la apoptosis.

Neoplasia. Alteración de la proliferación y, muchas veces, de la diferenciación celular, que se manifiesta por la formación de una masa o tumor.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Neutrófilos. También se conocen como leucocitos polimorfonucleares neutrofilicos. Son la clase más abundante de leucocitos en la sangre periférica humana. Poseen un núcleo multilobulado y gránulos neutrofilicos. Los neutrófilos son fagocitos que desempeñan un papel importante en la captura y muerte de patógenos extracelulares.

Núcleo. Estructura más característica de las células eucariotas. Se rodea de una cubierta propia, llamada envoltura nuclear y contiene el material hereditario, que es la base del repertorio de instrucciones en que se basa el desarrollo y el funcionamiento de cada organismo, y cuya composición se basa en el ácido desoxirribonucleico (ADN).

Oncogén. Gen anormal o activado que procede de la mutación o activación de un gen normal llamado protooncogén. Los oncogenes son los responsables de la transformación de una célula normal en una maligna que desarrollará un determinado tipo de cáncer.

Oncogénesis. Secuencia de cambios citológicos, genéticos y celulares que culminan en la transformación de una célula normal en otra cancerosa.

Oncología. Especialidad médica que estudia los tumores benignos y malignos, pero con especial atención a los malignos, esto es, al cáncer. Esta especialidad se ocupa del diagnóstico y tratamiento del cáncer, seguimiento de los pacientes, cuidados paliativos de pacientes en situación terminal, aspectos éticos relacionados con la atención a los enfermos con cáncer y estudios genéticos, tanto en la población general, como, en algunos casos, en familiares de pacientes (indicado en algunos tipos de tumores, en los que se conocen las bases hereditarias).

Oncovirus. Partículas infecciosas que tienen la capacidad de alterar el ciclo celular transformando las células normales en cancerosas (neoplásicas).

Órganos linfáticos (o linfoides). Son tejidos organizados que se caracterizan por un elevadísimo número de linfocitos, que contactan e interactúan con estroma no linfoide. Los órganos linfoides primarios son el timo y la médula ósea; en ellos se generan los linfocitos T y B, respectivamente. Los órganos linfoides secundarios son aquellos en que se inician las respuestas inmunitarias adaptativas, y están integrados por los ganglios linfáticos, el bazo y los tejidos linfoides asociados a mucosas, como las amígdalas y las placas de Peyer.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Órganos linfoides centrales. Son las localizaciones de desarrollo linfocítico. En humanos, los linfocitos B se desarrollan en la médula ósea, mientras que los linfocitos T lo hacen en el timo a partir de progenitores derivados de la médula ósea.

Órganos linfoides periféricos. Son los ganglios linfáticos, el bazo y los tejidos linfoides asociados a mucosas. En este tipo de órganos las respuestas inmunitarias son inducidas, mientras que en los órganos linfoides centrales se desarrollan linfocitos.

P53. Gen supresor de tumores localizado en el cromosoma 17 que induce a la apoptosis y destrucción de las células cancerosas. Sin embargo al mutar deja de ejercer el efecto protector, por lo que esas células, cuyo ADN suele estar dañado, en lugar de destruirse por apoptosis se dividen sin control, mutan rápidamente sus genes y al final se malignizan.

Perforina. Es una proteína que puede polimerizar, provocando poros en la membrana celular; ello constituye un mecanismo importante en la lisis de la célula diana en la citotoxicidad mediada por células. Las perforinas son producidas por células T citotóxicas y células NK, y se almacenan en gránulos que son liberados por la célula al contactar con la célula diana específica.

Plasma. Es la parte líquida de la sangre. Contiene agua, electrolitos y proteínas del plasma.

Presentación de antígeno. Designa la disposición del antígeno en forma de fragmentos peptídicos unidos a las moléculas de MHC en la superficie de una célula; las células T reconocen el antígeno sólo cuando se presenta de esta forma.

Proapoptótico. Sustancia o mecanismo que propicia la apoptosis y estorba la aparición y progresión del cáncer. Muchos de los genes supresores de tumores son proapoptóticos.

Procesamiento de antígeno. Consiste en la degradación de las proteínas en péptidos que pueden unirse a las moléculas de MHC para su presentación a las células T. Todos los antígenos (excepto los péptidos) deben ser procesados en péptidos antes de que puedan ser presentados por las moléculas del MHC.

Proliferación. Aumento de la cantidad de células en un tejido mediante la división por mitosis de las células en dos unidades con idéntico contenido genético y propiedades. La proliferación suele estar en relación inversa con la capacidad de diferenciación de las células.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Progenitores. Son progenies más diferenciadas de las células madre hematopoyéticas, que dan origen a los distintos subtipos de células hemáticas maduras y carecen de la capacidad de autorrenovación que caracteriza a las verdaderas células madre.

Proteína. Sustancia constitutiva de las células y de las materias vegetales y animales. Es un biopolímero formado por una o varias cadenas de aminoácidos, fundamental en la constitución y funcionamiento de la materia viva, como las enzimas, las hormonas, los anticuerpos, etc.

Quimiocinas. Son citocinas de escaso tamaño implicadas en la migración y activación de las células, especialmente las células fagocíticas y los linfocitos. Desempeñan un papel crucial en las respuestas inflamatorias.

Quimioterapia. Tratamiento médico basado en la administración de sustancias químicas (fármacos). Suele reservarse para los fármacos empleados en el tratamiento de las enfermedades neoplásicas que tienen como función el impedir la reproducción de las células cancerosas. Dichos fármacos se denominan medicamento citotástico, citostáticos o citotóxicos. La terapia antineoplásica tiene una gran limitación, que es su escasa especificidad. El mecanismo de acción es provocar una alteración celular ya sea en la síntesis de ácido nucleico, división celular o síntesis de proteínas. La acción de los diferentes citostáticos varía según la dosis a la que se administre. Debido a su inespecificidad afecta a otras células y tejidos normales del organismo, sobre todo si se encuentran en división activa.

Radioterapia. Tratamiento oncológico basado en el empleo de radiaciones ionizantes (rayos X o radiactividad, la que incluye los rayos gamma y las partículas alfa) para eliminar las células tumorales (generalmente cancerosas), en la parte del organismo donde se apliquen (tratamiento local). Este tratamiento actúa sobre el tumor, destruyendo las células malignas y así impide que crezcan y se reproduzcan.

Receptor de células T. Heterodímero unido por puentes disulfuro de dos cadenas peptídicas α y β , altamente variables, que se expresan en la membrana celular formando un complejo con las cadenas invariantes de CD3. Las células T con este tipo de receptor se denominan células T $\alpha\beta$. Existe un receptor alternativo formado por las cadenas variables γ y δ , que forman un complejo con CD3 que se expresa en una subpoblación de células T.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Receptores de citocinas. Son los receptores celulares de las citocinas. La unión de la citocina al receptor induce nuevas actividades en la célula, como el crecimiento, diferenciación o muerte.

Remisión completa. Desaparición de un cáncer de la exploración (remisión clínica), de los escáneres (radiográfica), o del examen microscópico de muestras de tejido (patológica). La remisión no siempre es equivalente a curación, debido a la frecuencia de las recidivas.

Respuesta inmunitaria adaptativa o inmunidad adaptativa o respuestas inmunitarias adquiridas. Se trata de la respuesta de linfocitos antígeno-específicos contra el antígeno en cuestión, incluyendo el desarrollo de la memoria inmunológica. Son generadas por la selección clonal de los linfocitos antígeno-específicos. Son distintas de las fases innatas de la inmunidad, en las cuales no existe selección clonal de linfocitos antígeno específicos.

Señal coestimuladora. Su presencia (junto con la unión del antígeno) es necesaria para la proliferación de los linfocitos. Dicha señal suele ser suministrada por una molécula presente en la superficie de la célula que muestra el antígeno. Para las células T, las señales coestimuladoras son B7.1 y B7.2, moléculas relacionadas entre sí que actúan como ligandos de las moléculas presentes en la membrana de las células T, CD28 y CTLA-4. En las células B, el ligando de CD40 cumple un papel análogo.

Singénicos. Se dice de animales genéticamente idénticos, es decir, pertenecientes a una misma cepa de una determinada especie.

Sintetasa de óxido nítrico (NO) inducible o INOS. Es expresada por macrófagos y muchas otras células, e inducida por numerosos estímulos diferentes a fin de activar la síntesis de NO. Este es el mecanismo principal de resistencia del huésped a la infección por gérmenes intracelulares en el ratón, y probablemente también en humanos.

Sistema inmunitario. Se trata del conjunto de tejidos, células y moléculas que intervienen en la inmunidad específica adaptativa; menos frecuentemente, el término se emplea también para referirse a la totalidad de los mecanismos de defensa del huésped.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Sistema linfático. Es el conjunto de canales linfáticos que drenan el fluido extracelular de los tejidos hacia la sangre a través del conducto torácico, que desemboca en la vena subclavia. Está formado por todos los órganos linfáticos, como los ganglios linfáticos y los tejidos linfáticos asociados a las mucosas (p. ej., las placas de Peyer) a excepción del bazo, que se comunica directamente con la sangre.

Suero. Componente líquido de la sangre coagulada.

Terapia biológica. Tratamiento que se vale del sistema inmunológico del organismo para combatir el cáncer. Las células, anticuerpos y órganos del sistema inmunológico actúan para proteger y defender al organismo de invasores externos, como bacterias y virus

Timo. Localización anatómica donde se produce el desarrollo de las células T. Se trata de un órgano linfoepitelial localizado en la parte superior del tórax, justo detrás del esternón.

Timocitos. Son las células linfoides que se encuentran en el timo. Principalmente se trata de células T en desarrollo, si bien algunos timocitos ya han alcanzado madurez funcional.

Título. El título de un antisuero es la medida de su concentración en anticuerpos específicos basada en diluciones seriadas hasta un punto final.

Tolerancia. Constituye la falta de respuesta a un antígeno. La tolerancia a antígenos propios es una característica esencial del sistema inmunitario; cuando se pierde, el sistema inmunitario puede atacar los tejidos propios, como ocurre en las enfermedades autoinmunitarias.

Traducción (del ARN mensajero). Proceso anabólico mediante el cual se forman las proteínas a partir de los aminoácidos. Es el paso siguiente a la transcripción del ADN a ARNm. También se conoce como síntesis de proteínas.

Transcripción. Proceso por el que las secuencias de ADN son copiadas a ARN mediante una enzima llamada ARN polimerasa. Este proceso produce ARN mensajero como primer paso de la síntesis de proteínas.

Transcriptasa inversa. Se trata de una enzima esencial de los retrovirus, ya que traduce el genoma de ARN a ADN antes de la integración en el ADN de la célula huésped. La transcriptasa inversa también permite convertir *in vitro* secuencias de

ARN en ADN complementario (ADNc), que luego puede ser clonado; en consecuencia, constituye un reactivo importante en biología molecular.

Tumor. Masa de células transformadas, con crecimiento y multiplicación anormales. Puede ser benigno o maligno.

Tumor primario. Crecimiento de células anormales o proliferación incontrolada de células en el lugar donde se origina el cáncer, en vez de diseminarse a este órgano de otras partes del cuerpo.

Tumor secundario. Metástasis.

Vaccinia. Fue la primera vacuna eficaz, destinada a tratar el virus de la viruela bovina. Causa infección limitada en los seres humanos y confiere inmunidad protectora contra el virus de la viruela humana.

Vacunación. Consiste en la inducción deliberada de inmunidad adaptativa frente a un germen patógeno mediante la inyección de una vacuna, que en general consiste en una forma muerta o atenuada (no patogénica) del germen en cuestión.

Virus. Son microorganismos patógenos compuestos de un genoma de ácidos nucleicos encerrados en una cubierta proteica. Pueden replicarse solamente en una célula viva, ya que no poseen el mecanismo metabólico necesario para alcanzar vida independiente.

Xenogénicos. Se dice de animales de especies diferentes.

ANEXO A

1.1 Análisis estadísticos ensayos antitumorales

Lecturas de absorbancia a 405nm (-490nm referencia) obtenidas tras ensayo de actividad antitumoral con diferentes líneas tumorales. A cada lectura se le sustrajo el valor blanco (Δ_{blank}). El dato de factor de enriquecimiento (EF) se obtuvo por la relación entre el valor abs. grupo tratado/ promedio abs. grupo control.



| HeLa 24h exposicion a rNDV-P05 | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|----------------------|-------|----------|-------|--------|--------|----------|--------|------------|
| Tratamiento | Abs 405-490nm Δblank | | Promedio | EF | | | Promedio | SE | |
| Control | 0,278 | 0,358 | 0,358 | 0,331 | 0,839 | 1,080 | 1,080 | 1,000 | 0,139 |
| 10HU | 0,466 | 0,497 | 0,524 | 0,496 | 1,406 | 1,500 | 1,581 | 1,496 | 0,088 |
| 50HU | 1,002 | 0,731 | 0,770 | 0,834 | 3,024 | 2,206 | 2,324 | 2,518 | 0,442 |
| Nucleosoma | 1,406 | | | | | | | | |
| Blank | 0,045 | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| HeLa 48h exposicion a rNDV-P05 | | | | | | | | | |
| Tratamiento | Abs 405-490nm Δblank | | Promedio | EF | | | Promedio | SE | |
| Control | 0,400 | 0,369 | 0,490 | 0,420 | 0,953 | 0,879 | 1,168 | 1,000 | 0,150 |
| 10HU | 1,002 | 1,093 | 1,117 | 1,071 | 2,388 | 2,604 | 2,662 | 2,551 | 0,145 |
| 50HU | 1,528 | 1,418 | 1,434 | 1,460 | 3,641 | 3,379 | 3,417 | 3,479 | 0,142 |
| Nucleosoma | 1,444 | | | | | | | | |
| Blank | 0,053 | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| HCC1954 24h exposicion a rNDV-P05 | | | | | | | | | |
| Tratamiento | Abs 405-490nm Δblank | | Promedio | EF | | | Promedio | SE | |
| Control | 0,030 | 0,028 | 0,037 | 0,032 | 0,947 | 0,884 | 1,168 | 1,000 | 0,149 |
| 10HU | 0,085 | 0,074 | 0,072 | 0,077 | 2,684 | 2,337 | 2,274 | 2,432 | 0,221 |
| 50HU | 0,132 | 0,158 | 0,182 | 0,157 | 4,168 | 4,989 | 5,747 | 4,968 | 0,790 |
| Nucleosoma | 1,406 | | | | | | | | |
| Blank | 0,045 | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| HCC1954 48h exposicion a rNDV-P05 | | | | | | | | | |
| Tratamiento | Abs 405-490nm Δblank | | Promedio | EF | | | Promedio | SE | |
| Control | 0,034 | 0,031 | 0,033 | 0,033 | 1,041 | 0,949 | 1,010 | 1,000 | 0,047 |
| 10HU | 0,332 | 0,385 | 0,385 | 0,367 | 10,163 | 11,786 | 11,786 | 11,245 | 0,937 |
| 50HU | 0,671 | 0,642 | 0,740 | 0,684 | 20,541 | 19,653 | 22,653 | 20,949 | 1,541 |
| Nucleosoma | 1,444 | | | | | | | | |
| Blank | 0,053 | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| HL-60 24h exposicion a rNDV-P05 | | | | | | | | | |
| Tratamiento | Abs 405-490nm Δblank | | Promedio | EF | | | Promedio | SE | |
| Control | 0,126 | 0,182 | 0,105 | 0,138 | 0,915 | 1,322 | 0,763 | 1,000 | 0,28913088 |
| 10HU | 0,724 | 0,483 | 0,662 | 0,623 | 5,259 | 3,508 | 4,809 | 4,525 | 0,90903572 |
| 50HU | 1,169 | 0,871 | 1,254 | 1,098 | 8,492 | 6,327 | 9,109 | 7,976 | 1,46098774 |
| Nucleosoma | 1,259 | | | | | | | | |
| Blank | 0,041 | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| HL-60 48h exposicion a rNDV-P05 | | | | | | | | | |
| Tratamiento | Abs 405-490nm Δblank | | Promedio | EF | | | Promedio | SE | |
| Control | 0,15 | 0,228 | 0,181 | 0,186 | 0,805 | 1,224 | 0,971 | 1,000 | 0,21076504 |
| 10HU | 0,41 | 0,384 | 0,442 | 0,412 | 2,200 | 2,061 | 2,372 | 2,211 | 0,1559124 |
| 50HU | 0,420 | 0,678 | 0,483 | 0,527 | 2,254 | 3,639 | 2,592 | 2,828 | 0,72187955 |
| Nucleosoma | 1,886 | | | | | | | | |
| Blank | 0,055 | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |

| HepG2 24h exposicion a rNDV-P05 | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|----------------------|-------|-------|----------|--------|--------|--------|----------|------------|-------|-------|
| Tratamiento | Abs 405-490nm Δblank | | | Promedio | EF | | | Promedio | SE | | |
| Control | 0,023 | 0,021 | 0,027 | 0,024 | 0,972 | 0,887 | 1,141 | 1,000 | 0,12908664 | | |
| 10HU | 0,206 | 0,201 | 0,19 | 0,199 | 8,704 | 8,493 | 8,028 | 8,408 | 0,34585998 | | |
| 50HU | 0,290 | 0,262 | 0,372 | 0,308 | 12,254 | 11,070 | 15,718 | 13,014 | 2,41548269 | | |
| Nucleosoma | 1,259 | | | | | | | | | | |
| Blank | 0,041 | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| HepG2 48h exposicion a rNDV-P05 | | | | | | | | | | | |
| Tratamiento | Abs 405-490nm Δblank | | | Promedio | EF | | | Promedio | SE | | |
| Control | 0,100 | 0,117 | 0,175 | 0,131 | 0,765 | 0,895 | 1,339 | 1,000 | 0,301 | | |
| 10HU | 1,398 | 1,503 | 1,442 | 1,448 | 10,699 | 11,503 | 11,036 | 11,079 | 0,404 | | |
| 50HU | 2,091 | 1,640 | 1,833 | 1,855 | 16,003 | 12,551 | 14,028 | 14,194 | 1,732 | | |
| Nucleosoma | 1,886 | | | | | | | | | | |
| Blank | 0,055 | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| A549 cells 24h exposicion a rNDV-P05 | | | | | | | | | | | |
| Tratamiento | Abs 405-490nm Δblank | | | Promedio | EF | | | Promedio | SE | | |
| Control | 0,109 | 0,098 | 0,108 | 0,105 | 1,038 | 0,933 | 1,029 | 1,000 | 0,058 | | |
| 10HU | 0,093 | 0,128 | 0,124 | 0,115 | 0,886 | 1,219 | 1,181 | 1,095 | 0,182 | | |
| 50HU | 0,090 | 0,107 | 0,085 | 0,094 | 0,857 | 1,019 | 0,810 | 0,895 | 0,110 | | |
| Nucleosoma | 1,179 | | | | | | | | | | |
| Blank | 0,045 | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| A549 cells 48h exposicion a rNDV-P05 | | | | | | | | | | | |
| Tratamiento | Abs 405-490nm Δblank | | | Promedio | EF | | | Promedio | SE | | |
| Control | 0,105 | 0,125 | 0,266 | 0,165 | 0,635 | 0,756 | 1,609 | 1,000 | 0,531 | | |
| 10HU | 0,105 | 0,121 | 0,092 | 0,106 | 0,635 | 0,732 | 0,556 | 0,641 | 0,088 | | |
| 50HU | 0,127 | 0,106 | 0,139 | 0,124 | 0,768 | 0,641 | 0,841 | 0,750 | 0,101 | | |
| Nucleosoma | 1,179 | | | | | | | | | | |
| Blank | 0,073 | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| PBMC 24h exposicion a rNDV-P05 | | | | | | | | | | | |
| Tratamiento | Abs 405-490nm Δblank | | | Promedio | EF | | | Promedio | SE | | |
| Control | 0,268 | 0,288 | 0,117 | 0,127 | 0,200 | 1,340 | 1,440 | 0,585 | 0,635 | 1,000 | 0,453 |
| 10HU | 0,177 | 0,231 | 0,124 | 0,061 | 0,148 | 0,885 | 1,155 | 0,620 | 0,305 | 0,741 | 0,364 |
| 50HU | 0,249 | 0,249 | 0,062 | 0,117 | 0,169 | 1,245 | 1,245 | 0,310 | 0,585 | 0,846 | 0,474 |
| Nucleosoma | 1,720 | | | | | | | | | | |
| Blank | 0,052 | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| PBMC 48h exposicion a rNDV-P05 | | | | | | | | | | | |
| Tratamiento | Abs 405-490nm Δblank | | | Promedio | EF | | | Promedio | SE | | |
| Control | 0,515 | 0,238 | 0,087 | 0,234 | 0,269 | 1,918 | 0,886 | 0,324 | 0,872 | 1,000 | 0,666 |
| 10HU | 0,236 | 0,062 | 0,112 | 0,147 | 0,139 | 0,879 | 0,231 | 0,417 | 0,547 | 0,519 | 0,273 |
| 50HU | 0,224 | 0,122 | 0,082 | 0,093 | 0,130 | 0,834 | 0,454 | 0,305 | 0,346 | 0,485 | 0,241 |
| Nucleosoma | 1,492 | | | | | | | | | | |
| Blank | 0,045 | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |

Análisis estadístico de los datos obtenidos tras los ensayos antitumorales sobre diferentes líneas tumorales. Los datos que se consideraron para su análisis fueron los valores de EF. El análisis estadístico se realizó con el programa estadístico GraphPad Prism 5.

1.1.1 HeLa

| Table Analyzed | | HeLa results para DUNNETT 24h | | | |
|---|------------|-------------------------------|------------------------|---------|-------------------|
| One-way analysis of variance | | | | | |
| P value | 0.0013 | | | | |
| P value summary | ** | | | | |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes | | | | |
| Number of groups | 3 | | | | |
| F | 24.23 | | | | |
| R squared | 0.8898 | | | | |
| ANOVA Table | | | | | |
| | SS | df | MS | | |
| Treatment (between columns) | 3.595 | 2 | 1.798 | | |
| Residual (within columns) | 0.4452 | 6 | 0.07421 | | |
| Total | 4.041 | 8 | | | |
| Dunnett's Multiple Comparison Test | | | | | |
| | Mean Diff. | q | Significant? P < 0.05? | Summary | 95% CI of diff |
| Control 24h vs 10HU 24h | -0.4960 | 2.230 | No | ns | -1.133 to 0.1408 |
| Control 24h vs 50HU 24h | -1.518 | 6.825 | Yes | *** | -2.155 to -0.8814 |

| Table Analyzed | | HeLa results para DUNNETT 48h | | | |
|---|------------|-------------------------------|------------------------|---------|------------------|
| One-way analysis of variance | | | | | |
| P value | < 0.0001 | | | | |
| P value summary | *** | | | | |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes | | | | |
| Number of groups | 3 | | | | |
| F | 222.8 | | | | |
| R squared | 0.9867 | | | | |
| ANOVA Table | | | | | |
| | SS | df | MS | | |
| Treatment (between columns) | 9.412 | 2 | 4.706 | | |
| Residual (within columns) | 0.1268 | 6 | 0.02113 | | |
| Total | 9.539 | 8 | | | |
| Dunnett's Multiple Comparison Test | | | | | |
| | Mean Diff. | q | Significant? P < 0.05? | Summary | 95% CI of diff |
| Control 48h vs 10HU 48h | -1.551 | 13.07 | Yes | *** | -1.891 to -1.211 |
| Control 48h vs 50HU 48h | -2.479 | 20.89 | Yes | *** | -2.819 to -2.139 |

| Table Analyzed | HeLa results | Table Analyzed | HeLa results |
|---|---------------------|---|---------------------|
| Column B | 10HU 24h | Column C | 50HU 24h |
| vs | vs | vs | vs |
| Column E | 10HU 48h | Column F | 50HU 48h |
| Unpaired t test | | Unpaired t test | |
| P value | 0.0004 | P value | 0.0231 |
| P value summary | *** | P value summary | * |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes | Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed | One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=10.81 df=4 | t, df | t=3.584 df=4 |
| How big is the difference? | | How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column B | 1.496 ± 0.05057 N=3 | Mean ± SEM of column C | 2.518 ± 0.2553 N=3 |
| Mean ± SEM of column E | 2.551 ± 0.08346 N=3 | Mean ± SEM of column F | 3.479 ± 0.08176 N=3 |
| Difference between means | -1.055 ± 0.09759 | Difference between means | -0.9608 ± 0.2681 |
| 95% confidence interval | -1.326 to -0.7844 | 95% confidence interval | -1.705 to -0.2167 |
| R squared | 0.9669 | R squared | 0.7626 |
| F test to compare variances | | F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 2.723, 2, 2 | F,DFn, Dfd | 9.749, 2, 2 |
| P value | 0.5371 | P value | 0.1861 |
| P value summary | ns | P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No | Are variances significantly different? | No |

| Table Analyzed | HeLa results | Table Analyzed | HeLa results |
|---|---------------------|---|---------------------|
| Column B | 10HU 24h | Column E | 10HU 48h |
| vs | vs | vs | vs |
| Column C | 50HU 24h | Column F | 50HU 48h |
| Unpaired t test | | Unpaired t test | |
| P value | 0.0171 | P value | 0.0014 |
| P value summary | * | P value summary | ** |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes | Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed | One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=3.927 df=4 | t, df | t=7.940 df=4 |
| How big is the difference? | | How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column B | 1.496 ± 0.05057 N=3 | Mean ± SEM of column E | 2.551 ± 0.08346 N=3 |
| Mean ± SEM of column C | 2.518 ± 0.2553 N=3 | Mean ± SEM of column F | 3.479 ± 0.08176 N=3 |
| Difference between means | -1.022 ± 0.2603 | Difference between means | -0.9277 ± 0.1168 |
| 95% confidence interval | -1.745 to -0.2997 | 95% confidence interval | -1.252 to -0.6034 |
| R squared | 0.7941 | R squared | 0.9403 |
| F test to compare variances | | F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 25.48, 2, 2 | F,DFn, Dfd | 1.042, 2, 2 |
| P value | 0.0755 | P value | 0.9794 |
| P value summary | ns | P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No | Are variances significantly different? | No |

1.1.2. HCC1954

| Table Analyzed | | HCC1954 results para DUNNETT 24 h | | | |
|---|------------|-----------------------------------|--------------|-----------|----------------|
| One-way analysis of variance | | | | | |
| P value | 0.0002 | | | | |
| P value summary | *** | | | | |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes | | | | |
| Number of groups | 3 | | | | |
| F | 52.33 | | | | |
| R squared | 0.9458 | | | | |
| ANOVA Table | | | | | |
| | SS | df | MS | | |
| Treatment (between columns) | 24.23 | 2 | 12.12 | | |
| Residual (within columns) | 1.389 | 6 | 0.2315 | | |
| Total | 25.62 | 8 | | | |
| Dunnett's Multiple Comparison Test | | | | | |
| | Mean Diff. | q | Significant? | F Summary | 95% CI of diff |
| Control 24h vs 10HU 24h | -1.432 | 3.645 | Yes | * | -2.557 to -0.3 |
| Control 24h vs 50HU 24h | -3.968 | 10.10 | Yes | *** | -5.093 to -2.8 |

| Table Analyzed | | HCC1954 results para DUNNETT 48H | | | |
|---|------------|----------------------------------|--------------|-----------|-----------------|
| One-way analysis of variance | | | | | |
| P value | < 0.0001 | | | | |
| P value summary | *** | | | | |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes | | | | |
| Number of groups | 3 | | | | |
| F | 275.1 | | | | |
| R squared | 0.9892 | | | | |
| ANOVA Table | | | | | |
| | SS | df | MS | | |
| Treatment (between columns) | 597.1 | 2 | 298.5 | | |
| Residual (within columns) | 6.510 | 6 | 1.085 | | |
| Total | 603.6 | 8 | | | |
| Dunnett's Multiple Comparison Test | | | | | |
| | Mean Diff. | q | Significant? | F Summary | 95% CI of diff |
| Control 48h vs 10HU 48h | -10.25 | 12.05 | Yes | *** | -12.68 to -7.8 |
| Control 48h vs 50HU 48h | -19.95 | 23.46 | Yes | *** | -22.38 to -17.5 |

| | | | |
|---|--------------------|---|--------------------|
| Table Analyzed | HCC1954 results | Table Analyzed | HCC1954 results |
| Column B | 10HU 24h | Column C | 50HU 24h |
| vs | vs | vs | vs |
| Column E | 10HU 48h | Column F | 50HU 48h |
| Unpaired t test | | Unpaired t test | |
| P value | < 0.0001 | P value | < 0.0001 |
| P value summary | *** | P value summary | *** |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes | Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed | One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=15.86 df=4 | t, df | t=15.99 df=4 |
| How big is the difference? | | How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column B | 2.432 ± 0.1275 N=3 | Mean ± SEM of column C | 4.968 ± 0.4559 N=3 |
| Mean ± SEM of column E | 11.25 ± 0.5410 N=3 | Mean ± SEM of column F | 20.95 ± 0.8897 N=3 |
| Difference between means | -8.813 ± 0.5558 | Difference between means | -15.98 ± 0.9997 |
| 95% confidence interval | -10.36 to -7.270 | 95% confidence interval | -18.76 to -13.21 |
| R squared | 0.9843 | R squared | 0.9846 |
| F test to compare variances | | F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 18.01, 2, 2 | F,DFn, Dfd | 3.808, 2, 2 |
| P value | 0.1052 | P value | 0.4160 |
| P value summary | ns | P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No | Are variances significantly different? | No |

1.1.3. HL-60

| | | | | | |
|---|--------------------------------|-------|------------------------|---------|------------------|
| Table Analyzed | HL-60 results para Dunnett 24h | | | | |
| One-way analysis of variance | | | | | |
| P value | 0.0005 | | | | |
| P value summary | *** | | | | |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes | | | | |
| Number of groups | 3 | | | | |
| F | 35.96 | | | | |
| R squared | 0.9230 | | | | |
| ANOVA Table | | | | | |
| | SS | df | MS | | |
| Treatment (between columns) | 73.00 | 2 | 36.50 | | |
| Residual (within columns) | 6.090 | 6 | 1.015 | | |
| Total | 79.09 | 8 | | | |
| Dunnett's Multiple Comparison Test | | | | | |
| | Mean Diff. | q | Significant? P < 0.05? | Summary | 95% CI of diff |
| Control 24h vs 10HU 24h | -3.525 | 4.286 | Yes | ** | -5.880 to -1.170 |
| Control 24h vs 50HU 24h | -6.976 | 8.481 | Yes | *** | -9.331 to -4.621 |

| | | | | |
|---|--------------------------------|-------|------------------------|-------------------|
| Table Analyzed | HL-60 results para Dunnett 48h | | | |
| One-way analysis of variance | | | | |
| P value | 0.0064 | | | |
| P value summary | ** | | | |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes | | | |
| Number of groups | 3 | | | |
| F | 13.19 | | | |
| R squared | 0.8147 | | | |
| ANOVA Table | SS | df | MS | |
| Treatment (between columns) | 5.190 | 2 | 2.595 | |
| Residual (within columns) | 1.180 | 6 | 0.1967 | |
| Total | 6.371 | 8 | | |
| Dunnett's Multiple Comparison Test | Mean Diff. | q | Significant? P < 0.05? | Summary |
| Control 48h vs 10HU 48h | -1.211 | 3.344 | Yes | * |
| Control 48h vs 50HU 48h | -1.828 | 5.048 | Yes | ** |
| | | | | 95% CI of diff |
| | | | | -2.248 to -0.1742 |
| | | | | -2.865 to -0.7915 |

| | | | |
|---|--------------------|---|---------------------|
| Table Analyzed | Column HL-60 | Table Analyzed | Column HL-60 |
| Column B | 10HU 24h | Column E | 10HU 48h |
| vs | vs | vs | vs |
| Column C | 50HU 24h | Column F | 50HU 48h |
| Unpaired t test | | Unpaired t test | |
| P value | 0.0255 | P value | 0.2213 |
| P value summary | * | P value summary | ns |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes | Are means signif. different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed | One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=3.473 df=4 | t, df | t=1.447 df=4 |
| How big is the difference? | | How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column B | 4.525 ± 0.5250 N=3 | Mean ± SEM of column E | 2.211 ± 0.08995 N=3 |
| Mean ± SEM of column C | 7.976 ± 0.8435 N=3 | Mean ± SEM of column F | 2.828 ± 0.4169 N=3 |
| Difference between means | -3.451 ± 0.9935 | Difference between means | -0.6173 ± 0.4265 |
| 95% confidence interval | -6.209 to -0.6926 | 95% confidence interval | -1.801 to 0.5666 |
| R squared | 0.7510 | R squared | 0.3437 |
| F test to compare variances | | F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 2.582, 2, 2 | F,DFn, Dfd | 21.48, 2, 2 |
| P value | 0.5584 | P value | 0.0890 |
| P value summary | ns | P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No | Are variances significantly different? | No |

| | | | |
|---|---------------------|---|--------------------|
| Table Analyzed | Column HL-60 | Table Analyzed | Column HL-60 |
| Column B | 10HU 24h | Column C | 50HU 24h |
| vs | vs | vs | vs |
| Column E | 10HU 48h | Column F | 50HU 48h |
| Unpaired t test | | Unpaired t test | |
| P value | 0.0122 | P value | 0.0054 |
| P value summary | * | P value summary | ** |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes | Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed | One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=4.345 df=4 | t, df | t=5.471 df=4 |
| How big is the difference? | | How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column B | 4.525 ± 0.5250 N=3 | Mean ± SEM of column C | 7.976 ± 0.8435 N=3 |
| Mean ± SEM of column E | 2.211 ± 0.08995 N=3 | Mean ± SEM of column F | 2.828 ± 0.4169 N=3 |
| Difference between means | 2.314 ± 0.5326 | Difference between means | 5.148 ± 0.9409 |
| 95% confidence interval | 0.8357 to 3.793 | 95% confidence interval | 2.536 to 7.760 |
| R squared | 0.8252 | R squared | 0.8821 |
| F test to compare variances | | F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 34.07, 2, 2 | F,DFn, Dfd | 4.094, 2, 2 |
| P value | 0.0570 | P value | 0.3927 |
| P value summary | ns | P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No | Are variances significantly different? | No |

1.1.4. HepG2

| | | | | | |
|---|--------------------------------|-------|------------------------|---------|------------------|
| Table Analyzed | HepG2 results para Dunnett 24h | | | | |
| One-way analysis of variance | | | | | |
| P value | 0.0001 | | | | |
| P value summary | *** | | | | |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes | | | | |
| Number of groups | 3 | | | | |
| F | 55.38 | | | | |
| R squared | 0.9486 | | | | |
| ANOVA Table | SS | df | MS | | |
| Treatment (between columns) | 220.4 | 2 | 110.2 | | |
| Residual (within columns) | 11.94 | 6 | 1.990 | | |
| Total | 232.4 | 8 | | | |
| Dunnett's Multiple Comparison Test | Mean Diff. | q | Significant? P < 0.05? | Summary | 95% CI of diff |
| Control 24h vs 10HU 24h | -7.408 | 6.432 | Yes | ** | -10.71 to -4.111 |
| Control 24h vs 50HU 24h | -12.01 | 10.43 | Yes | *** | -15.31 to -8.716 |

| Table Analyzed | HepG2 results para Dunnett 48h | | | | |
|---|--------------------------------|-------|------------------------|---------|------------------|
| One-way analysis of variance | | | | | |
| P value | < 0.0001 | | | | |
| P value summary | *** | | | | |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes | | | | |
| Number of groups | 3 | | | | |
| F | 131.6 | | | | |
| R squared | 0.9777 | | | | |
| ANOVA Table | SS | df | MS | | |
| Treatment (between columns) | 285.4 | 2 | 142.7 | | |
| Residual (within columns) | 6.507 | 6 | 1.084 | | |
| Total | 291.9 | 8 | | | |
| Dunnett's Multiple Comparison Test | Mean Diff. | q | Significant? P < 0.05? | Summary | 95% CI of diff |
| Control 48h vs 10HU 48h | -10.08 | 11.85 | Yes | *** | -12.51 to -7.646 |
| Control 48h vs 50HU 48h | -13.19 | 15.52 | Yes | *** | -15.63 to -10.76 |

| Table Analyzed | HepG2 results para | Table Analyzed | HepG2 exp. 21-3-16 |
|---|--------------------|---|--------------------|
| Column B | 10HU 24h | Column E | 10HU 48h |
| vs | vs | vs | vs |
| Column C | 50HU 24h | Column F | 50HU 48h |
| Unpaired t test | | Unpaired t test | |
| P value | 0.0308 | P value | 0.0386 |
| P value summary | * | P value summary | * |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes | Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed | One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=3.269 df=4 | t, df | t=3.033 df=4 |
| How big is the difference? | | How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column B | 8.408 ± 0.1997 N=3 | Mean ± SEM of column E | 11.08 ± 0.2331 N=3 |
| Mean ± SEM of column C | 13.01 ± 1.395 N=3 | Mean ± SEM of column F | 14.19 ± 1.000 N=3 |
| Difference between means | -4.606 ± 1.409 | Difference between means | -3.115 ± 1.027 |
| 95% confidence interval | -8.516 to -0.6950 | 95% confidence interval | -5.965 to -0.2644 |
| R squared | 0.7277 | R squared | 0.6970 |
| F test to compare variances | | F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 48.77, 2, 2 | F,DFn, Dfd | 18.40, 2, 2 |
| P value | 0.0402 | P value | 0.1031 |
| P value summary | * | P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | Yes | Are variances significantly different? | No |

| | | | |
|---|--------------------|---|--------------------|
| Table Analyzed | HepG2 exp. 21-3-16 | Table Analyzed | HepG2 exp. 21-3-16 |
| Column B | 10HU 24h | Column C | 50HU 24h |
| vs | vs | vs | vs |
| Column E | 10HU 48h | Column F | 50HU 48h |
| Unpaired t test | | Unpaired t test | |
| P value | 0.0010 | P value | 0.5295 |
| P value summary | *** | P value summary | ns |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes | Are means signif. different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed | One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=8.702 df=4 | t, df | t=0.6876 df=4 |
| How big is the difference? | | How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column B | 8.408 ± 0.1997 N=3 | Mean ± SEM of column C | 13.01 ± 1.395 N=3 |
| Mean ± SEM of column E | 11.08 ± 0.2331 N=3 | Mean ± SEM of column F | 14.19 ± 1.000 N=3 |
| Difference between means | -2.671 ± 0.3069 | Difference between means | -1.180 ± 1.716 |
| 95% confidence interval | -3.523 to -1.819 | 95% confidence interval | -5.944 to 3.584 |
| R squared | 0.9498 | R squared | 0.1057 |
| F test to compare variances | | F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 1.363, 2, 2 | F,DFn, Dfd | 1.945, 2, 2 |
| P value | 0.8465 | P value | 0.6791 |
| P value summary | ns | P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No | Are variances significantly different? | No |

1.1.5. A549

| | | | | | |
|---|-------------------------------|--------|------------------------|---------|-------------------|
| Table Analyzed | A549 results para Dunnett 24h | | | | |
| One-way analysis of variance | | | | | |
| P value | 0.2364 | | | | |
| P value summary | ns | | | | |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | No | | | | |
| Number of groups | 3 | | | | |
| F | 1.852 | | | | |
| R squared | 0.3817 | | | | |
| ANOVA Table | SS | df | MS | | |
| Treatment (between columns) | 0.06004 | 2 | 0.03002 | | |
| Residual (within columns) | 0.09727 | 6 | 0.01621 | | |
| Total | 0.1573 | 8 | | | |
| Dunnett's Multiple Comparison Test | Mean Diff. | q | Significant? P < 0.05? | Summary | 95% CI of diff |
| Control 24h vs 10HU 24h | -0.09533 | 0.9170 | No | ns | -0.3930 to 0.2023 |
| Control 24h vs 20HU 24h | 0.1047 | 1.007 | No | ns | -0.1930 to 0.4023 |

| Table Analyzed | | A549 results para Dunnett 48h | | | |
|---|------------|-------------------------------|------------------------|---------|-------------------|
| One-way analysis of variance | | | | | |
| P value | 0.4166 | | | | |
| P value summary | ns | | | | |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | No | | | | |
| Number of groups | 3 | | | | |
| F | 1.017 | | | | |
| R squared | 0.2531 | | | | |
| ANOVA Table | | | | | |
| | SS | df | MS | | |
| Treatment (between columns) | 0.2033 | 2 | 0.1016 | | |
| Residual (within columns) | 0.5997 | 6 | 0.09995 | | |
| Total | 0.8029 | 8 | | | |
| Dunnett's Multiple Comparison Test | | | | | |
| | Mean Diff. | q | Significant? P < 0.05? | Summary | 95% CI of diff |
| Control 48h vs 10HU 48h | 0.3590 | 1.391 | No | ns | -0.3800 to 1.098 |
| Control 48h vs 20HU 48h | 0.2500 | 0.9685 | No | ns | -0.4890 to 0.9890 |

1.1.6 PBMC

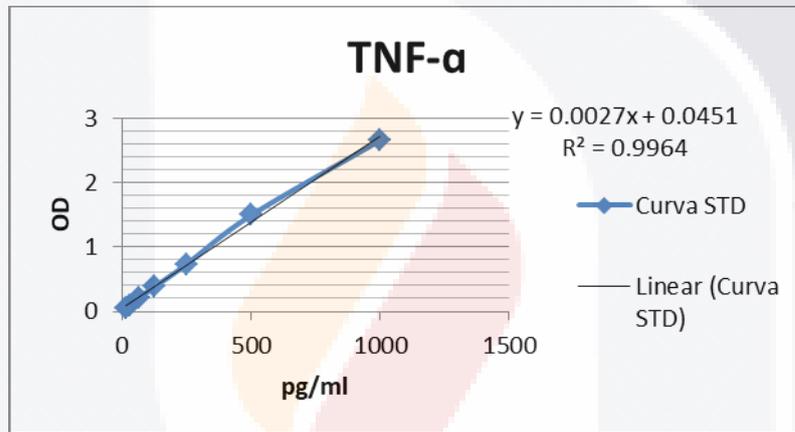
| Table Analyzed | | PBMC results para Dunnett 24h | | | |
|---|------------|-------------------------------|------------------------|---------|-------------------|
| One-way analysis of variance | | | | | |
| P value | 0.7061 | | | | |
| P value summary | ns | | | | |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | No | | | | |
| Number of groups | 3 | | | | |
| F | 0.3618 | | | | |
| R squared | 0.07441 | | | | |
| ANOVA Table | | | | | |
| | SS | df | MS | | |
| Treatment (between columns) | 0.1355 | 2 | 0.06774 | | |
| Residual (within columns) | 1.685 | 9 | 0.1873 | | |
| Total | 1.821 | 11 | | | |
| Dunnett's Multiple Comparison Test | | | | | |
| | Mean Diff. | q | Significant? P < 0.05? | Summary | 95% CI of diff |
| Control 24h vs 10HU 24h | 0.2588 | 0.8456 | No | ns | -0.5411 to 1.059 |
| Control 24h vs 20HU 24h | 0.1538 | 0.5025 | No | ns | -0.6461 to 0.9536 |

| Table Analyzed | | PBMC results para Dunnett 48h | | | |
|---|------------|-------------------------------|------------------------|---------|------------------|
| One-way analysis of variance | | | | | |
| P value | 0.2311 | | | | |
| P value summary | ns | | | | |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | No | | | | |
| Number of groups | 3 | | | | |
| F | 1.731 | | | | |
| R squared | 0.2779 | | | | |
| ANOVA Table | | | | | |
| | SS | df | MS | | |
| Treatment (between columns) | 0.6646 | 2 | 0.3323 | | |
| Residual (within columns) | 1.727 | 9 | 0.1919 | | |
| Total | 2.392 | 11 | | | |
| Dunnett's Multiple Comparison Test | | | | | |
| | Mean Diff. | q | Significant? P < 0.05? | Summary | 95% CI of diff |
| Control 48h vs 10HU 48h | 0.4815 | 1.554 | No | ns | -0.3282 to 1.291 |
| Control 48h vs 20HU 48h | 0.5153 | 1.663 | No | ns | -0.2945 to 1.325 |

1.2 Análisis estadísticos para la producción de citocinas por PBMC estimuladas con rNDV-P05.

1.2.1 TNF-α

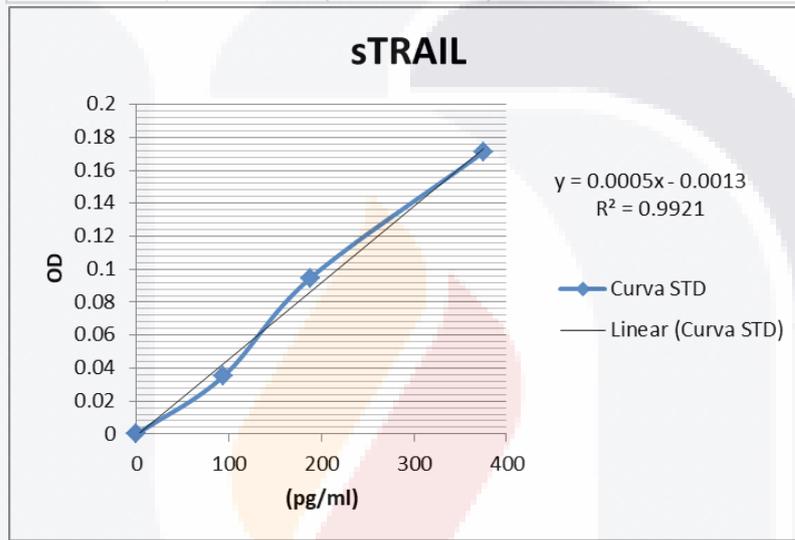
| Donante | TNF-α pg/ml 24h | | | |
|---------|-----------------|----------|----------|----------|
| | Control | 10HU | 20HU | LPS |
| 1 | 53.750 | 2505.833 | 2649.583 | 4457.917 |
| 1 | 49.583 | 2466.250 | 2512.083 | 4295.417 |
| 2 | 10.000 | 2805.833 | 2851.667 | 4457.917 |
| 2 | -6.667 | 2691.250 | 2864.167 | 4295.417 |
| 3 | 661.852 | 2658.148 | 2815.556 | 4095.185 |
| 3 | 610.000 | 2482.222 | 2717.407 | 3765.556 |
| 4 | 1126.667 | 1776.667 | 1787.778 | 2769.259 |
| 4 | 1106.667 | 1706.667 | 1707.778 | 2709.259 |
| 5 | 1232.222 | 1350.741 | 1815.556 | 6365.556 |
| 5 | 1202.222 | 1300.741 | 1805.556 | 6305.556 |



| Table Analyzed | PBMC TNF | Table Analyzed | PBMC TNF | Table Analyzed | PBMC TNF |
|---|--------------------|---|--------------------|---|--------------------|
| Column A | Control | Column A | Control | Column A | Control |
| vs | vs | vs | vs | vs | vs |
| Column B | 10HU | Column C | 20HU | Column D | LPS |
| Unpaired t test | | Unpaired t test | | Unpaired t test with Welch's correction | |
| P value | < 0.0001 | P value | < 0.0001 | P value | < 0.0001 |
| P value summary | *** | P value summary | *** | P value summary | *** |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes | Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes | Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed | One- or two-tailed P value? | Two-tailed | One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=6.279 df=18 | t, df | t=7.483 df=18 | Welch-corrected t, df | t=8.851 df=12 |
| How big is the difference? | | How big is the difference? | | How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column A | 604.6 ± 170.5 N=10 | Mean ± SEM of column A | 604.6 ± 170.5 N=10 | Mean ± SEM of column A | 604.6 ± 170.5 N=10 |
| Mean ± SEM of column B | 2174 ± 182.8 N=10 | Mean ± SEM of column C | 2353 ± 159.7 N=10 | Mean ± SEM of column D | 4352 ± 387.5 N=10 |
| Difference between means | -1570 ± 250.0 | Difference between means | -1748 ± 233.6 | Difference between means | -3747 ± 423.4 |
| 95% confidence interval | -2095 to -1045 | 95% confidence interval | -2239 to -1257 | 95% confidence interval | -4670 to -2825 |
| R squared | 0.6865 | R squared | 0.7567 | R squared | 0.8672 |
| F test to compare variances | | F test to compare variances | | F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 1.149, 9, 9 | F,DFn, Dfd | 1.141, 9, 9 | F,DFn, Dfd | 5.162, 9, 9 |
| P value | 0.8393 | P value | 0.8475 | P value | 0.0226 |
| P value summary | ns | P value summary | ns | P value summary | * |
| Are variances significantly different? | No | Are variances significantly different? | No | Are variances significantly different? | Yes |

1.2.2. sTRAIL

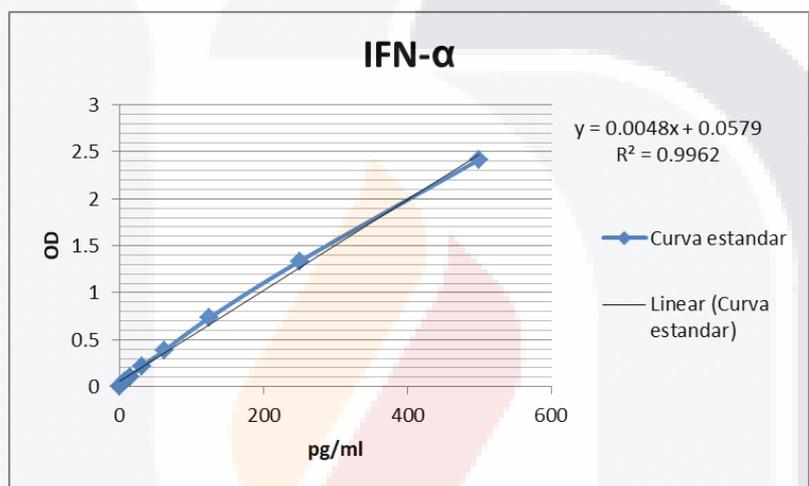
| Donante | sTRAIL pg/ml 24h | | | |
|---------|------------------|--------|--------|-------|
| | Control | 10HU | 20HU | LPS |
| 1 | 25.60 | 261.60 | 301.60 | 25.60 |
| 1 | 16.60 | 328.60 | 422.60 | 14.60 |
| 2 | 13.60 | 167.60 | 209.60 | 31.60 |
| 2 | 14.60 | 280.60 | 266.60 | 16.60 |
| 3 | 13.60 | 77.60 | 105.60 | -2.40 |
| 3 | 16.60 | 116.60 | 100.60 | 6.60 |
| 4 | 45.60 | 59.60 | 49.60 | 47.60 |
| 4 | 40.60 | 52.60 | 45.60 | 42.60 |
| 5 | 39.60 | 79.60 | 57.60 | 31.60 |
| 5 | 35.60 | 85.60 | 63.60 | 28.60 |



| Table Analyzed | PBMC sTRAIL | Table Analyzed | PBMC sTRAIL | Table Analyzed | PBMC sTRAIL |
|---|--------------------|---|--------------------|---|--------------------|
| Column A | Control | Column A | Control | Column A | Control |
| vs | vs | vs | vs | vs | vs |
| Column B | 10HU | Column C | 20HU | Column D | LPS |
| Unpaired t test with Welch's correction | | Unpaired t test with Welch's correction | | Unpaired t test with Welch's correction | |
| P value | 0.0041 | P value | 0.0097 | P value | 0.7697 |
| P value summary | ** | P value summary | ** | P value summary | ns |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes | Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes | Are means signif. different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed | One- or two-tailed P value? | Two-tailed | One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| Welch-corrected t, df | t=3.815 df=9 | Welch-corrected t, df | t=3.271 df=9 | Welch-corrected t, df | t=0.2974 df=17 |
| How big is the difference? | | How big is the difference? | | How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column A | 26.20 ± 4.067 N=10 | Mean ± SEM of column A | 26.20 ± 4.067 N=10 | Mean ± SEM of column A | 26.20 ± 4.067 N=10 |
| Mean ± SEM of column B | 151.0 ± 32.46 N=10 | Mean ± SEM of column C | 162.3 ± 41.41 N=10 | Mean ± SEM of column D | 24.30 ± 4.926 N=10 |
| Difference between means | -124.8 ± 32.71 | Difference between means | -136.1 ± 41.61 | Difference between means | 1.900 ± 6.388 |
| 95% confidence interval | -198.8 to -50.80 | 95% confidence interval | -230.2 to -41.98 | 95% confidence interval | -11.58 to 15.38 |
| R squared | 0.6179 | R squared | 0.5431 | R squared | 0.005177 |
| F test to compare variances | | F test to compare variances | | F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 63.71, 9, 9 | F,DFn, Dfd | 103.7, 9, 9 | F,DFn, Dfd | 1.467, 9, 9 |
| P value | < 0.0001 | P value | < 0.0001 | P value | 0.5769 |
| P value summary | *** | P value summary | *** | P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | Yes | Are variances significantly different? | Yes | Are variances significantly different? | No |

1.2.3. IFN-α

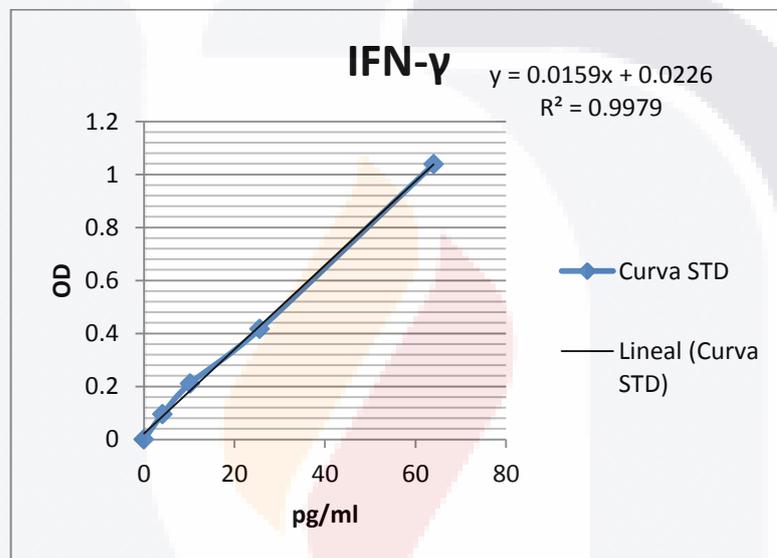
| Donante | IFN-α pg/ml 24h | | | |
|---------|-----------------|---------|---------|---------|
| | Control | 10HU | 20HU | LPS |
| 1 | -61.354 | 258.438 | 194.896 | -60.313 |
| 1 | -65.521 | 246.979 | 204.271 | -58.229 |
| 2 | -69.688 | 35.521 | 61.563 | -61.354 |
| 2 | -60.688 | 39.688 | 57.396 | -65.521 |
| 3 | -51.979 | 52.188 | 49.063 | -47.813 |
| 3 | -56.146 | 36.563 | 55.313 | -51.979 |
| 4 | -71.771 | -63.438 | -50.938 | -65.521 |
| 4 | -68.646 | -61.354 | -59.271 | -68.646 |
| 5 | -70.729 | -68.646 | -57.188 | -60.313 |
| 5 | -66.563 | -64.479 | -63.438 | -58.229 |



| Table Analyzed | PBMC IFN-a | Table Analyzed | PBMC IFN-a | Table Analyzed | PBMC IFN-a |
|---|---------------------|---|---------------------|---|---------------------|
| Column A | Control | Column A | Control | Column A | Control |
| vs | vs | vs | vs | vs | vs |
| Column B | 10HU | Column C | 20HU | Column D | LPS |
| Unpaired t test with Welch's correction | | Unpaired t test with Welch's correction | | Unpaired t test | |
| P value | 0.0234 | P value | 0.0099 | P value | 0.1346 |
| P value summary | * | P value summary | ** | P value summary | ns |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes | Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes | Are means signif. different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed | One- or two-tailed P value? | Two-tailed | One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| Welch-corrected t, df | t=2.725 df=9 | Welch-corrected t, df | t=3.259 df=9 | t, df | t=1.567 df=18 |
| How big is the difference? | | How big is the difference? | | How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column A | -64.31 ± 2.086 N=10 | Mean ± SEM of column A | -64.31 ± 2.086 N=10 | Mean ± SEM of column A | -64.31 ± 2.086 N=10 |
| Mean ± SEM of column B | 41.15 ± 38.65 N=10 | Mean ± SEM of column C | 39.17 ± 31.68 N=10 | Mean ± SEM of column D | -59.79 ± 1.990 N=10 |
| Difference between means | -105.5 ± 38.70 | Difference between means | -103.5 ± 31.75 | Difference between means | -4.517 ± 2.883 |
| 95% confidence interval | -193.0 to -17.91 | 95% confidence interval | -175.3 to -31.66 | 95% confidence interval | -10.57 to 1.541 |
| R squared | 0.4520 | R squared | 0.5413 | R squared | 0.1200 |
| F test to compare variances | | F test to compare variances | | F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 343.2, 9, 9 | F,DFn, Dfd | 230.6, 9, 9 | F,DFn, Dfd | 1.099, 9, 9 |
| P value | < 0.0001 | P value | < 0.0001 | P value | 0.8906 |
| P value summary | *** | P value summary | *** | P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | Yes | Are variances significantly different? | Yes | Are variances significantly different? | No |

1.2.4. IFN-γ

| Donante | IFN- γ pg/ml 24h | | | |
|---------|-------------------------|--------|--------|--------|
| | Control | 10HU | 20HU | LPS |
| 1 | -2.050 | 5.371 | 4.176 | 14.679 |
| 1 | -1.987 | 5.623 | 4.491 | 14.176 |
| 2 | -2.113 | 11.220 | 20.088 | 18.013 |
| 2 | -2.050 | 11.849 | 20.528 | 17.384 |
| 3 | -1.547 | 6.755 | 7.698 | 1.975 |
| 3 | -1.673 | 7.258 | 7.950 | 2.918 |
| 4 | -0.855 | 0.000 | -0.226 | 7.069 |
| 4 | -0.541 | 0.000 | -0.038 | 7.006 |
| 5 | 5.874 | 12.220 | 23.421 | 71.723 |
| 5 | 4.742 | 13.149 | 22.289 | 75.057 |



| Table Analyzed | PBMC IFN-g | Table Analyzed | PBMC IFN-g | Table Analyzed | PBMC IFN-g |
|---|---------------------------|---|---------------------------|---|---------------------------|
| Column A | Control | Column A | Control | Column A | Control |
| vs | vs | vs | vs | vs | vs |
| Column B | 10HU | Column C | 20HU | Column D | LPS |
| Unpaired t test | | Unpaired t test with Welch's correction | | Unpaired t test with Welch's correction | |
| P value | 0.0005 | P value | 0.0050 | P value | 0.0249 |
| P value summary | *** | P value summary | ** | P value summary | * |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes | Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes | Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed | One- or two-tailed P value? | Two-tailed | One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=4.233 df=18 | Welch-corrected t, df | t=3.577 df=10 | Welch-corrected t, df | t=2.687 df=9 |
| How big is the difference? | | How big is the difference? | | How big is the difference? | |
| Mean \pm SEM of column A | -0.2201 \pm 0.9402 N=10 | Mean \pm SEM of column A | -0.2201 \pm 0.9402 N=10 | Mean \pm SEM of column A | -0.2201 \pm 0.9402 N=10 |
| Mean \pm SEM of column B | 7.344 \pm 1.520 N=10 | Mean \pm SEM of column C | 11.04 \pm 3.004 N=10 | Mean \pm SEM of column D | 23.00 \pm 8.591 N=10 |
| Difference between means | -7.565 \pm 1.787 | Difference between means | -11.26 \pm 3.148 | Difference between means | -23.22 \pm 8.642 |
| 95% confidence interval | -11.32 to -3.810 | 95% confidence interval | -18.27 to -4.245 | 95% confidence interval | -42.77 to -3.672 |
| R squared | 0.4989 | R squared | 0.5613 | R squared | 0.4451 |
| F test to compare variances | | F test to compare variances | | F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 2.613, 9, 9 | F,DFn, Dfd | 10.21, 9, 9 | F,DFn, Dfd | 83.50, 9, 9 |
| P value | 0.1686 | P value | 0.0019 | P value | < 0.0001 |
| P value summary | ns | P value summary | ** | P value summary | *** |
| Are variances significantly different? | No | Are variances significantly different? | Yes | Are variances significantly different? | Yes |

1.3. Análisis estadísticos para la expresión (ARNm) de citocinas por PBMC estimuladas con rNDV-P05.

1.3.1. TNF- α

| Table Analyzed | | Table Analyzed | | TNF- α Incremento expression relativo a β -act | | | |
|---|------------------------|---|------------------------|---|---------|--------|--------|
| Column A | PBMC gen TNF- α | Column A | PBMC gen TNF- α | Donante | Control | LPS | rNDV |
| vs | Control | vs | Control | 1 | 0.8197 | 1.3089 | 1.0631 |
| Column C | rNDV | Column B | LPS | 1 | 1.5958 | 2.0833 | 2.4833 |
| Unpaired t test with Welch's correction | | Unpaired t test with Welch's correction | | 1 | 0.7645 | 1.9409 | 2.5609 |
| P value | 0.0056 | P value | 0.0819 | 2 | 1.1817 | 0.8562 | 3.7835 |
| P value summary | ** | P value summary | ns | 2 | 0.6567 | 0.4125 | 5.1326 |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes | Are means signif. different? (P < 0.05) | No | 2 | 1.2886 | 0.8255 | 5.5992 |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed | One- or two-tailed P value? | Two-tailed | 3 | 0.6716 | 2.9982 | 2.0257 |
| Welch-corrected t, df | t=3.755 df=8 | Welch-corrected t, df | t=1.958 df=9 | 3 | 0.9570 | 2.4007 | 1.4861 |
| How big is the difference? | | How big is the difference? | | 3 | 1.5560 | 4.5673 | 3.4307 |
| Mean \pm SEM of column A | 1.055 \pm 0.1219 N=9 | Mean \pm SEM of column A | 1.055 \pm 0.1219 N=9 | | | | |
| Mean \pm SEM of column C | 3.063 \pm 0.5207 N=9 | Mean \pm SEM of column B | 1.933 \pm 0.4315 N=9 | | | | |
| Difference between means | -2.008 \pm 0.5348 | Difference between means | -0.8780 \pm 0.4483 | | | | |
| 95% confidence interval | -3.241 to -0.7750 | 95% confidence interval | -1.892 to 0.1361 | | | | |
| R squared | 0.6380 | R squared | 0.2988 | | | | |
| F test to compare variances | | F test to compare variances | | | | | |
| F, DFn, Dfd | 18.26, 8, 8 | F, DFn, Dfd | 12.54, 8, 8 | | | | |
| P value | 0.0004 | P value | 0.0017 | | | | |
| P value summary | *** | P value summary | ** | | | | |
| Are variances significantly different? | Yes | Are variances significantly different? | Yes | | | | |

1.3.2. TRAIL

| Table Analyzed | | Table Analyzed | | TRAIL Incremento expression relativo a β -act | | | |
|---|------------------------|---|------------------------|---|---------|--------|---------|
| Column A | PBMC gen TRAIL | Column A | PBMC gen TRAIL | Donante | Control | LPS | rNDV |
| vs | Control | vs | Control | 1 | 0.5468 | 1.3352 | 3.6149 |
| Column C | rNDV | Column B | LPS | 1 | 1.9629 | 3.3169 | 16.0144 |
| Unpaired t test with Welch's correction | | Unpaired t test with Welch's correction | | 1 | 0.9317 | 4.6269 | 11.0347 |
| P value | 0.0015 | P value | 0.0489 | 2 | 0.7611 | 0.5109 | 4.8577 |
| P value summary | ** | P value summary | * | 2 | 1.4011 | 0.5740 | 5.5652 |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes | Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes | 2 | 0.9377 | 0.9940 | 5.2114 |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed | One- or two-tailed P value? | Two-tailed | 3 | 0.8590 | 5.2412 | 7.5891 |
| Welch-corrected t, df | t=4.723 df=8 | Welch-corrected t, df | t=2.320 df=8 | 3 | 0.4111 | 8.4518 | 8.0470 |
| How big is the difference? | | How big is the difference? | | 3 | 2.8316 | 8.5002 | 15.9106 |
| Mean \pm SEM of column A | 1.183 \pm 0.2577 N=9 | Mean \pm SEM of column A | 1.183 \pm 0.2577 N=9 | | | | |
| Mean \pm SEM of column C | 8.649 \pm 1.560 N=9 | Mean \pm SEM of column B | 3.728 \pm 1.066 N=9 | | | | |
| Difference between means | -7.467 \pm 1.581 | Difference between means | -2.545 \pm 1.097 | | | | |
| 95% confidence interval | -11.11 to -3.821 | 95% confidence interval | -5.075 to -0.01584 | | | | |
| R squared | 0.7360 | R squared | 0.4023 | | | | |
| F test to compare variances | | F test to compare variances | | | | | |
| F, DFn, Dfd | 36.65, 8, 8 | F, DFn, Dfd | 17.12, 8, 8 | | | | |
| P value | < 0.0001 | P value | 0.0006 | | | | |
| P value summary | *** | P value summary | *** | | | | |
| Are variances significantly different? | Yes | Are variances significantly different? | Yes | | | | |

1.3.3. IFN- α

| Table Analyzed | PBMC gen IFN-a | Table Analyzed | PBMC gen IFN-a |
|---|--------------------|---|---------------------|
| Column A | Control | Column A | Control |
| vs | vs | vs | vs |
| Column C | rNDV | Column B | LPS |
| Unpaired t test with Welch's correction | | Unpaired t test | |
| P value | 0.0035 | P value | 0.0979 |
| P value summary | ** | P value summary | ns |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes | Are means signif. different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed | One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| Welch-corrected t, df | t=4.093 df=8 | t, df | t=1.758 df=16 |
| How big is the difference? | | How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column A | 1.048 ± 0.1112 N=9 | Mean ± SEM of column A | 1.048 ± 0.1112 N=9 |
| Mean ± SEM of column C | 10.80 ± 2.379 N=9 | Mean ± SEM of column B | 0.7338 ± 0.1402 N=9 |
| Difference between means | -9.747 ± 2.381 | Difference between means | 0.3145 ± 0.1789 |
| 95% confidence interval | -15.24 to -4.255 | 95% confidence interval | -0.06477 to 0.6938 |
| R squared | 0.6768 | R squared | 0.1619 |
| F test to compare variances | | F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 457.9, 8, 8 | F,DFn, Dfd | 1.590, 8, 8 |
| P value | < 0.0001 | P value | 0.5265 |
| P value summary | *** | P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | Yes | Are variances significantly different? | No |

| | IFN-α Incremento expresión relativo a β-act | | | |
|---|---|---------|--------|---------|
| | Donante | Control | LPS | rNDV |
| 1 | | 0.7611 | 0.8747 | 11.7069 |
| 1 | | 1.4011 | 0.8788 | 10.9229 |
| 1 | | 0.9377 | 0.8512 | 8.8722 |
| 2 | | 1.3121 | 1.0000 | 2.2533 |
| 2 | | 0.6708 | 1.0000 | 9.0188 |
| 2 | | 1.1362 | 0.0000 | 7.0863 |
| 3 | | 0.6182 | 1.0000 | 16.9388 |
| 3 | | 1.0346 | 0.0000 | 4.2975 |
| 3 | | 1.5636 | 1.0000 | 26.0601 |

1.3.4. IFN-γ

| Table Analyzed | PBMC gen IFN-g | Table Analyzed | PBMC gen IFN-g |
|---|---------------------|---|---------------------|
| Column A | Control | Column A | Control |
| vs | vs | vs | vs |
| Column C | rNDV | Column B | LPS |
| Unpaired t test with Welch's correction | | Unpaired t test with Welch's correction | |
| P value | 0.0101 | P value | 0.0859 |
| P value summary | * | P value summary | ns |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes | Are means signif. different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed | One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| Welch-corrected t, df | t=3.352 df=8 | Welch-corrected t, df | t=1.958 df=8 |
| How big is the difference? | | How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column A | 0.9171 ± 0.1231 N=9 | Mean ± SEM of column A | 0.9171 ± 0.1231 N=9 |
| Mean ± SEM of column C | 11.41 ± 3.127 N=9 | Mean ± SEM of column B | 4.751 ± 1.954 N=9 |
| Difference between means | -10.49 ± 3.130 | Difference between means | -3.834 ± 1.958 |
| 95% confidence interval | -17.71 to -3.273 | 95% confidence interval | -8.349 to 0.6808 |
| R squared | 0.5841 | R squared | 0.3240 |
| F test to compare variances | | F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 645.4, 8, 8 | F,DFn, Dfd | 252.0, 8, 8 |
| P value | < 0.0001 | P value | < 0.0001 |
| P value summary | *** | P value summary | *** |
| Are variances significantly different? | Yes | Are variances significantly different? | Yes |

| | IFN-γ Incremento expresión relativo a β-act | | | |
|---|---|---------|---------|---------|
| | Donante | Control | LPS | rNDV |
| 1 | | 0.7773 | 0.7048 | 2.2408 |
| 1 | | 1.2866 | 0.9997 | 3.6181 |
| 1 | | 0.0913 | 1.3713 | 7.6530 |
| 2 | | 1.0648 | 1.1780 | 7.8332 |
| 2 | | 0.7209 | 1.0980 | 10.6095 |
| 2 | | 1.3027 | 1.0661 | 6.7041 |
| 3 | | 0.9507 | 7.8199 | 9.6804 |
| 3 | | 1.1234 | 15.4947 | 29.4346 |
| 3 | | 0.9363 | 13.0276 | 24.8923 |

1.4 Análisis estadístico caracterización fisicoquímica de rNDV-P05.

1.4.1 Determinación de la actividad hemaglutinante de rNDV-P05 en diferentes valores de pH.

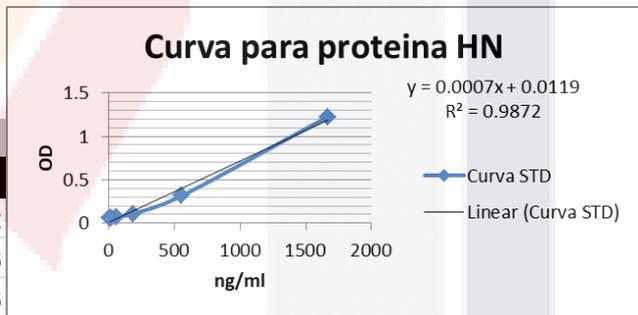
| Inverso del título HU (replica) | pH | | | |
|---------------------------------|----|----|-----|----|
| | 3 | 5 | 7.4 | 9 |
| 1 | 32 | 64 | 128 | 64 |
| 2 | 32 | 64 | 128 | 64 |
| 3 | 32 | 64 | 128 | 64 |
| 4 | 32 | 64 | 128 | 64 |
| 5 | 32 | 64 | 128 | 64 |
| 6 | 32 | 64 | 128 | 64 |

| Table Analyzed | | Hemagglutination assay NDV pH's | | |
|--|------------|---------------------------------|------------------------|---------|
| One-way analysis of variance | | | | |
| P value | < 0.0001 | | | |
| P value summary | *** | | | |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes | | | |
| Number of groups | 4 | | | |
| F | 12160 | | | |
| R squared | 0.9995 | | | |
| Bartlett's test for equal variances | | | | |
| Bartlett's statistic (corrected) | 0.0000 | | | |
| P value | 1.0000 | | | |
| P value summary | ns | | | |
| Do the variances differ signif. (P < 0.05) | No | | | |
| ANOVA Table | | | | |
| | SS | df | MS | |
| Treatment (between columns) | 29180 | 3 | 9728 | |
| Residual (within columns) | 16.00 | 20 | 0.8000 | |
| Total | 29200 | 23 | | |
| Dunnett's Multiple Comparison Test | | | | |
| | Mean Diff. | q | Significant? P < 0.05? | Summary |
| 7.4 vs 3 | 96.00 | 185.9 | Yes | *** |
| 7.4 vs 5 | 64.00 | 123.9 | Yes | *** |
| 7.4 vs 9 | 64.00 | 123.9 | Yes | *** |

1.5 Analisis estadístico de la proteína HN expresada en *N. benthamiana*.

1.5.1 Proteína HN (µg/ml) precipitada por el método de metanol/cloroformo

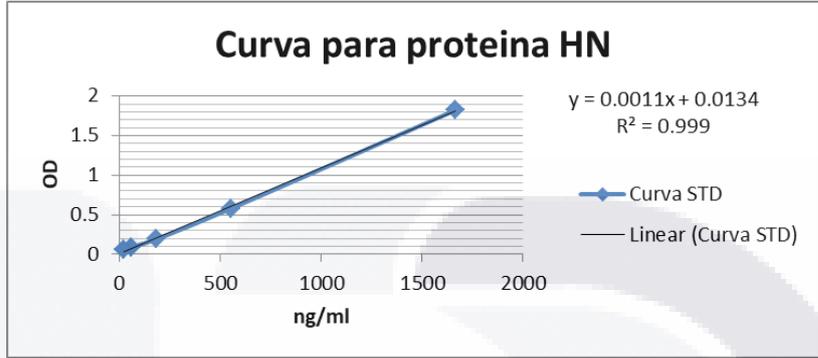
| dH2O | | TBS | |
|-------------|----------|-------------|----------|
| No filtrado | Filtrado | No filtrado | Filtrado |
| 3.725 | 0.562 | 5.439 | 0.382 |
| 3.446 | 0.596 | 5.709 | 0.326 |
| 4.192 | 0.643 | 5.799 | 0.36 |



| t test | | dH2O | | t test | | TBS | | t test | | dH2O vs TBS | |
|---|--|-----------------------------|--|---|--|----------------------|--|---|--|----------------------|--|
| Table Analyzed | | HN purificada precipitacion | | Table Analyzed | | HN purificada | | Table Analyzed | | HN purificada | |
| Column A | | No filtrado | | Column C | | No filtrado | | Column B | | Filtrado | |
| vs | | vs | | vs | | vs | | vs | | vs | |
| Column B | | Filtrado | | Column D | | Filtrado | | Column D | | Filtrado | |
| Unpaired t test with Welch's correction | | | | | | | | | | | |
| P value | | 0.0047 | | P value | | 0.0004 | | P value | | 0.0010 | |
| P value summary | | ** | | P value summary | | *** | | P value summary | | ** | |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | | Yes | | Are means signif. different? (P < 0.05) | | Yes | | Are means signif. different? (P < 0.05) | | Yes | |
| One- or two-tailed P value? | | Two-tailed | | One- or two-tailed P value? | | Two-tailed | | One- or two-tailed P value? | | Two-tailed | |
| Welch-corrected t, df | | t=14.56 df=2 | | Welch-corrected t, df | | t=48.39 df=2 | | t, df | | t=8.549 df=4 | |
| How big is the difference? | | | | | | | | | | | |
| Mean ± SEM of column A | | 3.788 ± 0.2176 N=3 | | Mean ± SEM of column C | | 5.649 ± 0.1082 N=3 | | Mean ± SEM of column B | | 0.6003 ± 0.02348 N=3 | |
| Mean ± SEM of column B | | 0.6003 ± 0.02348 N=3 | | Mean ± SEM of column D | | 0.3560 ± 0.01629 N=3 | | Mean ± SEM of column D | | 0.3560 ± 0.01629 N=3 | |
| Difference between means | | 3.187 ± 0.2189 | | Difference between means | | 5.293 ± 0.1094 | | Difference between means | | 0.2443 ± 0.02858 | |
| 95% confidence interval | | 2.245 to 4.129 | | 95% confidence interval | | 4.822 to 5.764 | | 95% confidence interval | | 0.1650 to 0.3237 | |
| R squared | | 0.9907 | | R squared | | 0.9991 | | R squared | | 0.9481 | |
| F test to compare variances | | | | | | | | | | | |
| F,DFn, Dfd | | 85.88, 2, 2 | | F,DFn, Dfd | | 44.10, 2, 2 | | F,DFn, Dfd | | 2.078, 2, 2 | |
| P value | | 0.0230 | | P value | | 0.0444 | | P value | | 0.6497 | |
| P value summary | | * | | P value summary | | * | | P value summary | | ns | |
| Are variances significantly different? | | Yes | | Are variances significantly different? | | Yes | | Are variances significantly different? | | No | |

1.5.2 Proteina HN (ng/ml) analizada en microsomas.

| Sobrenadante | | Debris | | Microsoma | |
|--------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|
| No filtrado | Filtrado | No filtrado | Filtrado | No filtrado | Filtrado |
| 495.2 | 230 | 686.1 | 261.8 | 454.2 | -10.9 |
| 457.3 | 148.2 | 1180 | 111.8 | 399.7 | 16.4 |
| 219.4 | 111.8 | 655.8 | 98.2 | 442.1 | -6.4 |



| t test | Sobrenadante | t test | Debris | t test | Microsoma |
|---|-------------------|---|-------------------|---|---------------------|
| Table Analyzed | HN microsomas | Table Analyzed | HN microsomas | Table Analyzed | HN microsomas |
| Column A | No filtrado | Column C | No filtrado | Column E | No filtrado |
| vs | vs | vs | vs | vs | vs |
| Column B | Filtrado | Column D | Filtrado | Column F | Filtrado |
| Unpaired t test | | Unpaired t test | | Unpaired t test | |
| P value | 0.0711 | P value | 0.0184 | P value | < 0.0001 |
| P value summary | ns | P value summary | * | P value summary | *** |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | No | Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes | Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed | One- or two-tailed P value? | Two-tailed | One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=2.441 df=4 | t, df | t=3.843 df=4 | t, df | t=23.29 df=4 |
| How big is the difference? | | How big is the difference? | | How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column A | 390.6 ± 86.31 N=3 | Mean ± SEM of column C | 840.6 ± 169.9 N=3 | Mean ± SEM of column E | 432.0 ± 16.52 N=3 |
| Mean ± SEM of column B | 163.3 ± 34.95 N=3 | Mean ± SEM of column D | 157.3 ± 52.41 N=3 | Mean ± SEM of column F | -0.3000 ± 8.450 N=3 |
| Difference between means | 227.3 ± 93.12 | Difference between means | 683.4 ± 177.8 | Difference between means | 432.3 ± 18.56 |
| 95% confidence interval | -31.20 to 485.8 | 95% confidence interval | 189.8 to 1177 | 95% confidence interval | 380.8 to 483.8 |
| R squared | 0.5983 | R squared | 0.7869 | R squared | 0.9927 |
| F test to compare variances | | F test to compare variances | | F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 6.099, 2, 2 | F,DFn, Dfd | 10.51, 2, 2 | F,DFn, Dfd | 3.823, 2, 2 |
| P value | 0.2817 | P value | 0.1738 | P value | 0.4147 |
| P value summary | ns | P value summary | ns | P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No | Are variances significantly different? | No | Are variances significantly different? | No |

| 1way ANOVA | | Todas fracciones No filtrado | |
|---|---------------|------------------------------|--------|
| Table Analyzed | HN microsomas | | |
| One-way analysis of variance | | | |
| P value | 0.0513 | | |
| P value summary | ns | | |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | No | | |
| Number of groups | 3 | | |
| F | 5.072 | | |
| R squared | 0.6283 | | |
| ANOVA Table | | | |
| Treatment (between columns) | SS | df | MS |
| | 371200 | 2 | 185600 |
| Residual (within columns) | 219600 | 6 | 36590 |
| Total | 590700 | 8 | |

| 1way ANOVA | | Todas las fracciones Filtrado | | | |
|---|---------------|-------------------------------|------------------------|---------|------------------|
| Table Analyzed | HN microsomas | | | | |
| One-way analysis of variance | | | | | |
| P value | 0.0326 | | | | |
| P value summary | * | | | | |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes | | | | |
| Number of groups | 3 | | | | |
| F | 6.391 | | | | |
| R squared | 0.6805 | | | | |
| ANOVA Table | | | | | |
| Treatment (between columns) | SS | df | MS | | |
| | 51640 | 2 | 25820 | | |
| Residual (within columns) | 24240 | 6 | 4040 | | |
| Total | 75880 | 8 | | | |
| Dunnett's Multiple Comparison Test | | | | | |
| | Mean Diff. | q | Significant? P < 0.05? | Summary | 95% CI of diff |
| Filtrado vs Filtrado | -163.6 | 3.153 | Yes | * | -312.2 to -15.06 |
| Filtrado vs Filtrado | -157.6 | 3.036 | Yes | * | -306.1 to -8.992 |

1.5.3 Proteina HN (ng/ml) analizada del extracto de *N. benthamiana*.

| | |
|---|-------------------|
| Table Analyzed | Extracto N benth |
| Column A | No filtrado |
| vs | |
| Column B | Filtrado |
| Unpaired t test | |
| P value | 0.0361 |
| P value summary | * |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=3.105 df=4 |
| How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column A | 1372 ± 127.7 N=3 |
| Mean ± SEM of column B | 890.6 ± 88.24 N=3 |
| Difference between means | 481.8 ± 155.2 |
| 95% confidence interval | 51.03 to 912.6 |
| R squared | 0.7067 |
| F test to compare variances | |
| F,DFn, Dfd | 2.093, 2, 2 |
| P value | 0.6466 |
| P value summary | ns |
| Are variances significantly different? | No |

| Extracto N. benth | |
|-------------------|----------|
| No filtrado | Filtrado |
| 1625.5 | 789.1 |
| 1216.4 | 816.4 |
| 1275.5 | 1066.4 |

