

Medicina Veterinária / Patologia Animal

## ATIVIDADE ONCOLÍTICA DO VÍRUS NDV-GFP EM CÉLULAS DE LINFOMA FELINO FELV-POSITIVAS

Talita G. L. Alves<sup>1\*</sup>, Pedro L. P. Xavier<sup>2</sup>, Taismara K. Garnica<sup>3</sup>, Arina L. Rochetti<sup>4</sup>, Felipe Haddad<sup>5</sup>, Márcio A. Brunetto<sup>6</sup>, Helena L. Ferreira<sup>7</sup>, Heidge Fukumasu<sup>8</sup>

1. Aluna da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA-USP)
2. Pesquisador da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP
3. Pesquisadora da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP
4. Técnica do Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional (LOCT-USP)
5. Pesquisador da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP)
6. Professor Associado da FMVZ-USP - Departamento de Nutrição e Produção Animal
7. Professora Associada da FZEA-USP - Departamento de Medicina Veterinária
8. Professor Associado da FZEA-USP - Departamento de Medicina Veterinária

### Resumo

O linfoma é a neoplasia mais frequente em gatos e muitos animais não respondem ao tratamento convencional e apresentam recidivas, com destaque para animais positivos para o Vírus da Leucemia Felina (FeLV). Portanto, é urgente o desenvolvimento de terapias mais eficientes, uma vez que os resultados obtidos podem beneficiar tanto a medicina veterinária quanto a medicina humana dado a importância da pesquisa oncológica comparada. O Vírus da Doença de Newcastle (NDV) é oncolítico para alguns tipos de células neoplásicas e versões modificadas desse vírus têm sido estudadas como potencial abordagem terapêutica, inclusive pelo nosso grupo de pesquisa, em células de câncer de mama canino. Tal vulnerabilidade pode estar relacionada com a baixa expressão de genes da via de interferon e outros mecanismos imunomediados. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial oncolítico do NDV-GFP em linhagem de células de linfoma felino oriundas de um gato positivo para FeLV.

**Autorização legal:** CEUA FZEA-USP (nº 1537130919)

**Palavras-chave:** Neoplasia; gato; terapia.

**Apoio financeiro:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 143954/2021-0) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2014/02493-7)

**Trabalho selecionado para a JNIC:** Pró-Reitoria de Pesquisa da USP

### Introdução

Os linfomas são caracterizados pela proliferação clonal de linfócitos malignos. No Brasil, infecções retrovirais ainda desempenham papel importante no desenvolvimento desta neoplasia em felinos<sup>1,2</sup>. Há maior prevalência da forma mediastinal em gatos positivos para FeLV, um retrovírus oncogênico, e o prognóstico é desfavorável para esses pacientes<sup>3,4</sup>. A resistência à quimioterapia é a principal causa de morte nesses animais<sup>5,6</sup> e a busca por novas abordagens terapêuticas é urgente. Sendo assim, os resultados obtidos através do estudo desse tipo de neoplasia em felinos podem não apenas aprimorar o entendimento do linfoma em gatos, como também em humanos, visto que os dados obtidos de pacientes com tumores espontâneos têm maior caráter preditivo<sup>7</sup>.

As terapias com vírus considerados oncolíticos têm se destacado como potenciais terapias contra o câncer<sup>8</sup>. Tais vírus possuem a capacidade de se replicarem seletivamente em células neoplásicas e controlar a progressão tumoral. Essa especificidade pode estar relacionada com a perda do mecanismo de proteção contra infecções, observada na maioria das células neoplásicas, de forma a permitir maior taxa de replicação quando comparado às células saudáveis<sup>9</sup>.

O Vírus da Doença de Newcastle (NDV) é um dos vírus cuja atividade oncolítica foi verificada. O NDV possui virulência variável e circula tanto em espécies de aves domésticas quanto de aves silvestres<sup>10</sup>. Seus efeitos oncolíticos possuem relação com a ativação da via intrínseca e extrínseca de apoptose, a via do estresse do retículo endoplasmático e as vias receptoras da tirosina quinase, além de mecanismos imunomediados<sup>11</sup>. Nosso grupo demonstrou recentemente que essa resposta está relacionada com a baixa expressão de genes da via de interferon- $\beta$  em células de câncer de mama canino<sup>12</sup>.

Por conseguinte, visto a importância do estudo de novas terapias para o linfoma em gatos e o seu potencial em estudos comparativos, o objetivo do nosso trabalho foi testar o potencial oncolítico do NDV recombinante em células derivadas de um felino com linfoma de origem tímica e positivo para o vírus da FeLV.

### Metodologia

A linhagem celular de linfoma de células T de origem tímica e positivo para FeLV (FELV 3281) foi adquirida do Biobanco de células Riken (Japão)<sup>13</sup> e caracterizada previamente pelo nosso grupo de pesquisa. O NDV-GFP utilizado neste estudo é um vírus vacinal da estirpe La Sota que foi modificado geneticamente para expressão de GFP por Janke e colaboradores<sup>14</sup> e inicialmente cedida para o Dr. Muhammad Munir (Lancaster

University, Inglaterra) em colaboração com a Profa. Dra. Helena Lage Ferreira (FZEA-USP).

O título viral foi determinado nas células neoplásicas segundo o método Reed Muench<sup>15</sup>. Para isso, células FELV 3281 foram infectadas com diferentes diluições do vírus NDV ( $10^{-1}$  –  $10^{-11}$ ) e avaliadas durante 5 dias por microscopia em campo claro e fluorescente para que fossem evidenciados, respectivamente, os efeitos citopáticos e a presença de vírus nas células pela expressão de GFP.

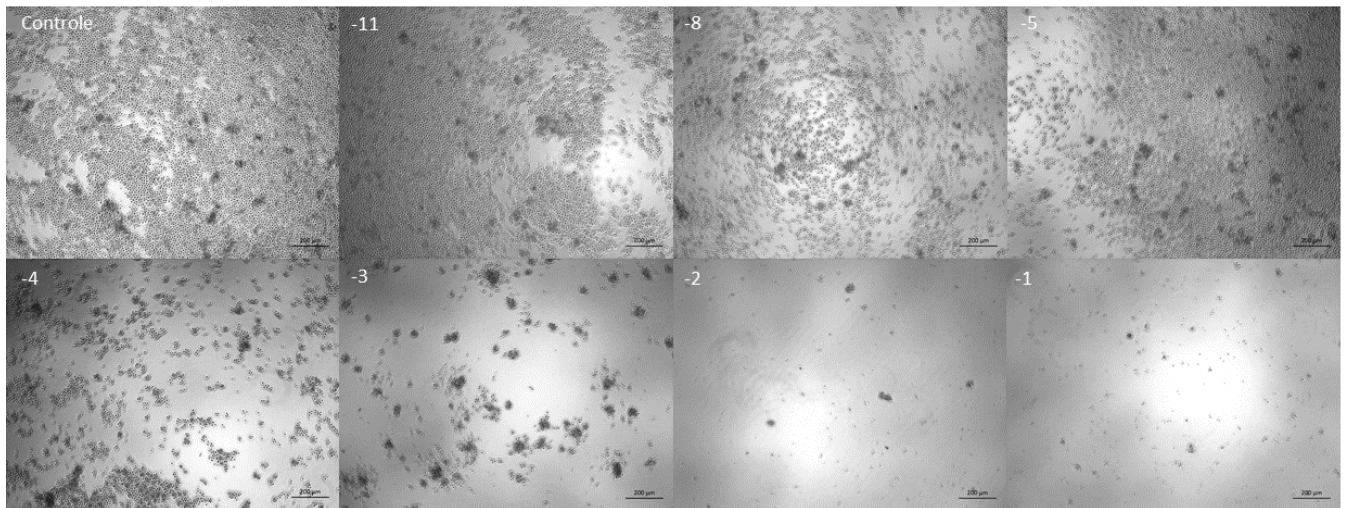
O potencial citotóxico do NDV foi observado através da determinação da concentração inibitória média ( $IC_{50}$ ). Foram realizados ensaios de citotoxicidade tanto nas células neoplásicas quanto nas células saudáveis (PBMCs), essas que foram isoladas do sangue total de gatos saudáveis que compõem o gatil experimental do Centro de Pesquisa em Nutrologia de Cães e Gatos (FMVZ-USP) com o auxílio do reagente do Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich, BR).

As células tumorais foram submetidas a diluições seriadas com índice de multiplicidade de infecção (MOI) de 1, 0.2, 0.04, 0.008, 0.0016, 0.00032, 0.000064 e 0.00001 em sextuplicata técnica e triplicata biológica. As células foram mantidas a 37°C e 5% de  $CO_2$  durante 72 horas e, após esse período, foi realizado o ensaio colorimétrico de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide). A leitura de absorbância foi realizada em espectrofotômetro com 540 nm de comprimento de onda (LMR 96 – Loccus, Brasil) e a viabilidade celular foi medida em termos de absorbância. A determinação da  $IC_{50}$  foi realizada pelo software GraphPad Prism 8.0 (San Diego, EUA) utilizando regressão não-linear. As PBMCs foram submetidas em triplicata à  $IC_{50}$  calculada previamente nas células tumorais.

Também, foi conduzida análise de ciclo celular com a técnica da impregnação nuclear com iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich, EUA). Para isso, as células foram tratadas com a  $IC_{50}$ , em triplicata, durante 72 horas e fixadas em álcool etílico 70% P.A – A.C.S. (Dinâmica Ltda., Brasil). Foram adquiridos 10.000 eventos por citometria de fluxo (S3TM Cell Sorter, EUA) utilizando filtro FL2 ( $585 \pm 42$  nm) e os gráficos gerados pelo aparelho foram analisados pelo software FCS Express 7 (De Novo Software). Os resultados foram expressos em % de células nas fases G1, G0/G1, S ou G2/M, distribuídos na forma de histogramas e analisados utilizando ANOVA de duas vias<sup>16</sup>.

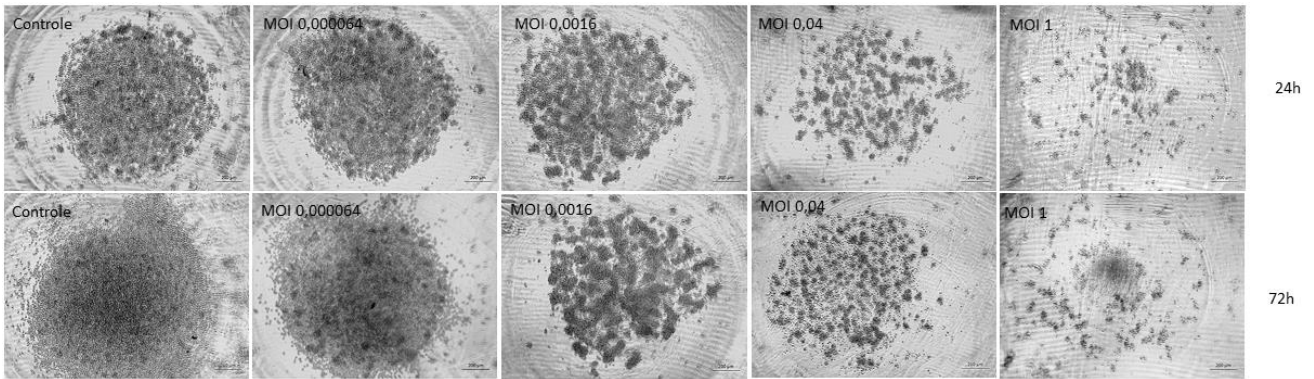
## Resultados e Discussão

O título obtido para a amostra foi de  $3,16 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL (*Median Tissue Culture Infectious Dose*). O principal efeito citopático observado foi a presença de *mortalidade* celular nas maiores concentrações virais estudadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ ) (Fig.1). Estes resultados sugerem que o NDV-GFP foi capaz de se multiplicar nas células cancerosas felinas. Como demonstrado em células de outras espécies, o vírus é capaz de induzir a lise de células neoplásicas através de mecanismos diretos como o de apoptose ou de mecanismos indiretos como a ativação de macrófagos e células natural killers, a diminuição da expressão do MHC, entre outros<sup>11</sup>.

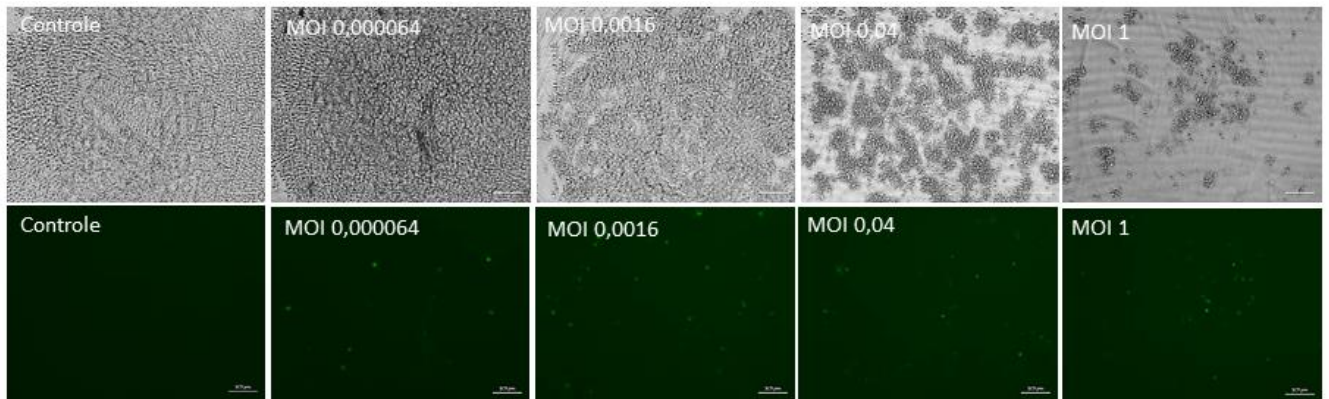


**Figura 1: Análise dos efeitos citopáticos em campo claro 96 horas pós-infecção em células de linfoma felino FELV 3281.** Observa-se, respectivamente, o controle e as concentrações  $10^{-11}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-1}$ . Até a concentração  $10^{-5}$ , tem-se concentração de células semelhante ao controle. A partir da concentração  $10^{-4}$ , a confluência decai gradativamente, sendo possível supor relação de dose dependência a partir dessa concentração. Aumento de 50x.

Em relação ao teste de viabilidade celular, foi determinada  $IC_{50}$  de  $2 \times 10^{-3}$  MOI. Além disso, observamos novamente um efeito de dose dependência (Fig. 2) e houve expressão de GFP em todas as concentrações nas quais as células foram submetidas. Entretanto, a expressão foi mais significativa nas primeiras 24 horas. Não houve emissão de fluorescência nas células não tratadas, o que sugere que os efeitos citopáticos observados foram desencadeados pelo vírus, dado que tal expressão apenas ocorre onde há replicação viral (Fig. 3)<sup>14</sup>.



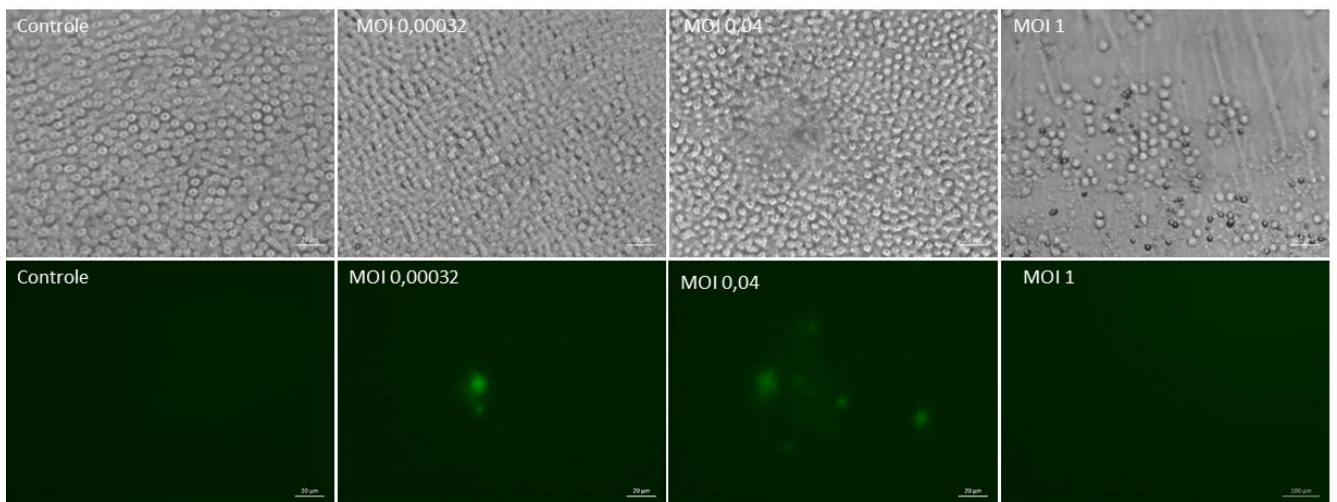
**Figura 2: Determinação do efeito citotóxico do vírus nas células de linfoma felino.** Nota-se, novamente, efeito de dose dependência, no qual os poços controle e àqueles submetidos ao MOI=0,000064 apresentaram confluência de 100%. Já aqueles submetidos ao MOI=0,0016 (próximo a IC<sub>50</sub>) apresentaram confluência de cerca de 50%. Por fim, observou-se confluência menor do que 5% no MOI=1. Aumento de 50x.



**Figura 3: Análise da expressão de GFP na FELV 3281.** Nos campos apresentados, observa-se a expressão de GFP 24 horas pós-infecção. Não há expressão de GFP nas células não tratadas. Aumento de 100x.

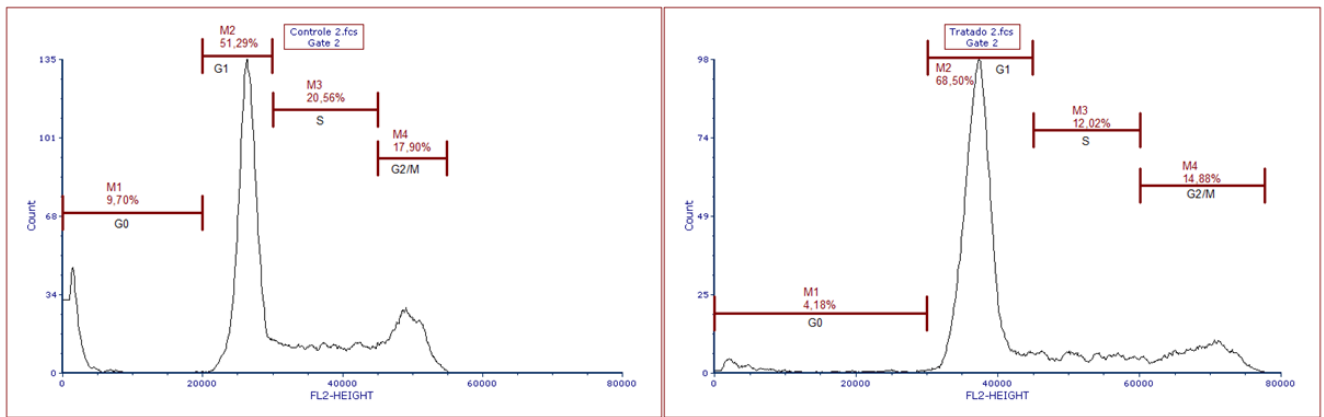
Com relação às células saudáveis (PBMCs), foi verificada ocorrência de morte celular ou diminuição da proliferação celular nas células submetidas ao MOI=1, que corresponde à maior concentração de vírus utilizada neste ensaio. Porém, os poços das demais concentrações apresentaram confluência semelhante àquela observada nos poços controle (Fig. 4). Entretanto, o MTT não obteve resultado esperado e outro ensaio será realizado para confirmar se o NDV-GFP não é citotóxico para as PBMCs.

Quanto à expressão de GFP, foi possível observá-la em todas as concentrações virais (Fig. 4). No entanto, a emissão de fluorescência foi maior nas primeiras 48 horas do experimento. Isso sugere que apesar de poucos efeitos citotóxicos observados havia presença de células infectadas em todas as concentrações. A replicação nas células felinas já era algo esperado pelo nosso grupo de pesquisa. Entretanto, não há evidência de que o vírus do genótipo estudado seria capaz de induzir um quadro patológico na espécie em questão.



**Figura 4: Análise da expressão de GFP nas PBMCs.** Nos campos apresentados, observa-se que há expressão de GFP até 72 horas pós-infecção. Não há expressão de GFP nas células não tratadas e no MOI 1. Aumento de 400x.

Além disso, observamos que o NDV-GFP é capaz de induzir paralização na fase G1 do ciclo celular ( $p < 0,05$ ). Esse efeito foi responsável por reduzir o número de células na fase S e, conseqüentemente, resulta em diminuição da proliferação celular (Fig 5).



**Figura 5: Análise do ciclo celular pós infecção.** Histogramas referentes às células FELV 3281 sem (esquerda) e com (direita) tratamento com o NDV-GFP. Nota-se que nas células tratadas houve aumento das fases G0/G1 e, consequente, diminuição da fase S das fases G2/M.

### Conclusões

A partir dos resultados, conclui-se que o vírus NDV-GFP tem maior seletividade e é oncolítico em células de linfoma felino FELV 3281. Sendo assim, vislumbra-se uma nova possibilidade terapêutica para casos de linfoma em gatos com resistência aos protocolos quimioterápicos convencionais. Ademais, espera-se que os resultados obtidos também possam beneficiar outras espécies.

### Referências bibliográficas

1. Little, S. E. *O Gato – Medicina Interna*. (Roca, 2015).
2. Louwerens, M., London, C. A., Pedersen, N. C. & Lyons, L. A. Feline lymphoma in the post-feline leukemia virus era. *J. Vet. Intern. Med.* **19**, 329–335 (2005).
3. Biezus, G. *et al.* Prevalence of and factors associated with feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV) in cats of the state of Santa Catarina, Brazil. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **63**, 17–21 (2019).
4. Leite-Filho, R. V. *et al.* Epidemiological, pathological and immunohistochemical aspects of 125 cases of feline lymphoma in Southern Brazil. *Vet. Comp. Oncol.* **18**, 224–230 (2020).
5. Daleck, C. A. & De Nardi, A. B. *Oncologia em Cães e Gatos*. (Roca, 2016).
6. Jericó, M. M., Kogika, M. M. & Neto, J. P. de A. *Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos*. (Roca, 2015).
7. Fördös, I., Fazekas, J., Singer, J. & Jensen-Jarolim, E. Translating clinical trials from human to veterinary oncology and back. *J. Transl. Med.* **13**, 1–7 (2015).
8. Fukuhara, H., Ino, Y. & Todo, T. Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn. *Cancer Sci.* **107**, 1373–1379 (2016).
9. Ravindra, P. V. *et al.* Time course of Newcastle disease virus-induced apoptotic pathways. *Virus Res.* **144**, 350–354 (2009).
10. Ferreira, H. L. *et al.* Virulent Newcastle disease viruses from chicken origin are more pathogenic and transmissible to chickens than viruses normally maintained in wild birds. *Vet. Microbiol.* **235**, 25–34 (2019).
11. Palese, P. & Zamarin, D. Oncolytic Specificity of Newcastle Disease Virus Is Mediated by Selectivity for Apoptosis-Resistant Cells. *J. Virol.* **85**, 6015–6023 (2011).
12. Santos, M. R. *et al.* Oncolytic effect of Newcastle disease virus is attributed to interferon regulation in canine mammary cancer cell lines. *Vet. Comp. Oncol.* **19**, 593–601 (2021).
13. Rojko, J. L. *et al.* Feline Lymphomas: Immunological and Cytochemical Characterization. *Cancer Res.* **49**, 345–351 (1989).
14. Janke, M. *et al.* 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 (2007).
15. Reed, L. J.; Muench, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* **72**, 546–558 (1938).
16. Fukumasu, H. Sobre os efeitos quimiopreventivos e antitumorais do guaraná, *Paullinia cupana* var. *sorbilis*, em modelos experimentais in vivo e in vitro. 1–38 (2008).