

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ARLINDA FLORES COLETO

EFEITO ONCOLÍTICO DA CEPA VACINAL LA SOTA DO VÍRUS DA DOENÇA DE
NEWCASTLE EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS E PROSTÁTICAS: ANÁLISES EM
MODELOS *IN VITRO*, *IN OVO* E *IN VIVO*

UBERLÂNDIA – MG

2025

ARLINDA FLORES COLETO

Efeito oncolítico da cepa vacinal La Sota do vírus da doença de Newcastle em neoplasias mamárias e prostáticas: análises em modelos *in vitro*, *in ovo* e *in vivo*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Saúde Animal

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi

UBERLÂNDIA - MG

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C694e
2025

Coleto, Arlinda Flores, 1987-
Efeito oncolítico da cepa vacinal La Sota do vírus da doença de
Newcastle em neoplasias mamárias e prostáticas [recurso eletrônico] :
análises em modelos *in vitro*, *in ovo* e *in vivo* / Arlinda Flores Coleto. -
2025.

Orientadora: Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de
Pós-graduação em Ciências Veterinárias.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2025.5020>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Veterinária. I. Medeiros-Ronchi, Alessandra Aparecida, 1971-,
(Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

André Carlos Francisco
Bibliotecário-Documentalista - CRB-6/3408



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Ciências Veterinárias				
Defesa de:	Tese Doutorado Acadêmico PPGCVET Nº 02/2025				
Data:	28 de fevereiro de 2025	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	17:30
Matrícula do Discente:	12013VET002				
Nome do Discente:	Arlinda Flores Coletto				
Título do Trabalho:	Efeito oncolítico da cepa vacinal La Sota do vírus da doença de Newcastle em neoplasias mamárias e prostáticas: análises em modelos in vitro, in ovo e in vivo				
Área de concentração:	Saúde Animal				
Linha de pesquisa:	Investigação Etiológica				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Patologia oncológica e epidemiologia das neoplasias dos animais domésticos				

Reuniu-se por vídeo conferência, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: Dra. Belchiolina Beatriz Fonseca - (FMVZ/UFU); Dra. Tatiane Furtado de Carvalho - (FMVZ/UFU); Dr. Denner Santos dos Anjos - (UNESP/JABOTICABAL); Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves - (UNESP/BOTUCATU) e Dra. Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi - (FMVZ/UFU) orientadora da candidata.

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Dra. Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu à Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir a senhora presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir a candidata. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando a candidata:

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação

interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Alessandra Aparecida Medeiros Ronchi, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/02/2025, às 17:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Denner Santos dos Anjos, Usuário Externo**, em 28/02/2025, às 17:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tatiane Furtado de Carvalho, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/02/2025, às 17:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Belchiolina Beatriz Fonseca, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/02/2025, às 17:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Eduardo Fonseca Alves, Usuário Externo**, em 05/03/2025, às 17:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **6090880** e o código CRC **684EFFF7**.

ARLINDA FLORES COLETO

Efeito oncolítico da cepa vacinal La Sota do vírus da doença de Newcastle em neoplasias mamárias e prostáticas: análises em modelos *in vitro*, *in ovo* e *in vivo*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Saúde Animal

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi

Uberlândia, 28 de fevereiro de 2025

Prof^ª. Dr^ª. Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi
(Orientadora) – FAMEV/UFU

Profa. Pós-Doc Belchiolina Beatriz Fonseca – UFU

Profa. Pós-Doc Vivian Alonso Goulart – UFU

Prof. Dr. Denner Santos dos Anjos - Unesp-FCAV-Jaboticabal

Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves - Unesp-Botucatu

Ao meu filho Victor, minha inspiração e fonte de alegria.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força e pela oportunidade de alcançar este momento tão significativo em minha vida acadêmica.

À minha querida irmã, pelo apoio incondicional e pelo incentivo constante ao longo desta jornada.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, pela confiança e pelo sacrifício em me proporcionar educação e oportunidades para realizar meus sonhos.

Aos meus amigos, pela paciência, compreensão e momentos de descontração que foram essenciais para manter o equilíbrio durante os desafios desta caminhada.

À Universidade Federal de Uberlândia, pelo ambiente acadêmico propício ao desenvolvimento da pesquisa e pela excelência no ensino.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – PPGCV UFU e ao Curso de Medicina Veterinária – FAMEV UFU, pelos recursos disponibilizados e pela formação de qualidade que contribuíram para minha capacitação profissional.

Aos órgãos de fomento Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Rede Mineira de Pesquisa Translacional em Imunobiológicos e Biofármacos no Câncer (REMITRIBIC, RED-00031-21), Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia (INCT-TeraNano), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq Grant n° 403193/2022-2) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG Grant n° CBB-APQ-03613-17) pela concessão da bolsa de estudos, que viabilizou financeiramente minha pesquisa.

À minha orientadora, a Profa. Dra. Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi, pelo apoio e orientação que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (HOVET-UFU), minha profunda gratidão pelo apoio prestado. A colaboração e o suporte oferecidos foram inestimáveis

para o sucesso do meu projeto. Agradeço imensamente pela dedicação e empenho de toda a equipe, que me apoiou com zelo e profissionalismo no cuidado das pacientes envolvidas no estudo.

Aos laboratórios, bem como toda a equipe, Laboratório de Patologia Animal (PAVET), Laboratório de Incubação de aves (LIAVE) e ao Laboratório de Nanobiotecnologia (NANOS), pelas condições de trabalho, infraestrutura e colaboração indispensáveis para a realização dos experimentos e análises.

Aos meus colegas, Teresiamá, Paula Lima, Simone, Danilo, Tainá, Luiza, Paula Braga, Letícia e Emília, pela troca de experiências, pelo companheirismo e pelo suporte mútuo ao longo desta trajetória acadêmica.

Às pacientes que ainda lutam, sua força nos inspira a seguir em frente, buscando novas formas de cuidado e tratamento. E àquela que partiu, seu legado permanece vivo, guiando-nos na busca pelo conhecimento e pela cura. Elas não foram apenas pacientes, mas protagonistas de uma história de dedicação, ciência e amor. Obrigada por cada ensinamento, por cada batalha enfrentada com coragem. Sua contribuição à ciência jamais será esquecida.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho, meu profundo agradecimento. Esta conquista não seria possível sem o apoio e a colaboração de cada um de vocês.

Por fim, uma homenagem póstuma ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, que mesmo sem ter tido a oportunidade de conhecê-lo pessoalmente, impactou profundamente a trajetória do meu doutorado. Sua genialidade como pesquisador, aliada à sua visão e crença em nossa proposta de estudo, foram fundamentais para o avanço do nosso trabalho. Infelizmente, ele nos deixou antes de poder testemunhar os frutos deste projeto. Que sua memória e legado continuem a inspirar futuros pesquisadores, assim como ele inspirou a todos nós. Seu espírito inovador e dedicação à ciência viverão para sempre em nossos corações e nas descobertas que possibilitou.

RESUMO

Desde a década de 1950, a capacidade oncolítica do vírus da doença de Newcastle (VDN) tem sido relatada, sendo atualmente reconhecido como medicina alternativa e complementar. Desde então, diversos estudos têm demonstrado o potencial terapêutico de cepas selvagens e recombinantes do Paramyxovírus aviário tipo 1, seja como monoterapia ou em combinação com outros tratamentos, com efeitos oncolíticos observados tanto *in vitro*, quanto em humanos e modelos animais. No contexto da oncologia veterinária, os tumores mamários são as neoplasias mais frequentemente diagnosticadas em cadelas, com alta taxa de malignidade. No entanto, poucos estudos avaliaram os efeitos oncolíticos da cepa La Sota do VDN em tumores mamários caninos. O presente estudo foi dividido em três capítulos. O primeiro abordou considerações gerais. O segundo capítulo abordou a eficácia oncolítica da cepa La Sota do VDN em células de adenocarcinoma prostático humano PC-3 e investigou *ex ovo* seus efeitos sobre xenoinxertos de células PC-3, analisando inibição, regressão, angiogênese e liberação de citocinas. Os resultados indicaram uma redução na viabilidade das células tumorais PC-3 de maneira dose-dependente, sem afetar significativamente células normais, além da inibição do crescimento tumoral de xenoinxerto de células PC-3 no modelo CAM (membrana corioalantoide). Já o terceiro capítulo abordou a eficácia oncolítica da cepa La Sota do VDN em células de carcinoma mamário canino CMT-U27 e a eficácia *in vivo* do impacto terapêutico da administração intravenosa do vírus em cadelas portadoras de carcinomas mamários espontâneos. Nos resultados, foi observada redução na viabilidade das células tumorais CMT-U27 de maneira dose-dependente, sem afetar significativamente células normais. Já no teste clínico, três cadelas receberam três infusões intravenosas do VDN, resultando em eventos adversos manejáveis. A resposta ao tratamento foi heterogênea: uma cadela apresentou estabilização da doença, enquanto duas tiveram progressão tumoral, sugerindo que fatores individuais influenciaram a eficácia da viroterapia. Além disso, a detecção de anticorpos IgG contra o vírus em duas pacientes indicou ativação imunológica. Embora preliminares, os achados reforçam a necessidade de protocolos terapêuticos mais estruturados e estudos com um maior número de animais e terapias combinadas, sugerindo que o VDN pode representar uma abordagem inovadora e promissora no tratamento de neoplasias mamárias em cães, contribuindo para o avanço da oncologia veterinária.

Palavras-chave: tumores mamários; oncologia; viroterapia; vírus da doença de Newcastle; NDV.

ABSTRACT

Since the 1950s, the oncolytic capacity of Newcastle disease virus (NDV) has been reported, and it is currently recognized as an alternative and complementary medicine. Since then, several studies have demonstrated the therapeutic potential of wild-type and recombinant strains of avian Paramyxovirus type 1, either as monotherapy or in combination with other treatments, with oncolytic effects observed both in vitro and in humans and animal models. In veterinary oncology, mammary tumors are the most frequently diagnosed neoplasms in female dogs and present a high malignancy rate. However, few studies have evaluated the oncolytic effects of the La Sota strain of NDV on canine mammary tumors. The present study was divided into three chapters. The first addressed general considerations. The second chapter investigated the oncolytic efficacy of the La Sota strain of NDV on human prostate adenocarcinoma PC-3 cells and its ex ovo effects on PC-3 cell xenografts, analyzing inhibition, regression, angiogenesis, and cytokine release. The results indicated a dose-dependent reduction in PC-3 tumor cell viability, without significantly affecting normal cells, as well as inhibition of xenograft tumor growth in the chorioallantoic membrane (CAM) model. The third chapter focused on the oncolytic efficacy of the La Sota strain of NDV on CMT-U27 canine mammary carcinoma cells and the in vivo therapeutic impact of intravenous virus administration in female dogs with spontaneous mammary carcinomas. The findings demonstrated a dose-dependent reduction in CMT-U27 tumor cell viability without significantly affecting normal cells. In the clinical trial, three female dogs received three intravenous NDV infusions, resulting in manageable adverse events. Treatment response was heterogeneous: one dog showed disease stabilization, while two experienced tumor progression, suggesting that individual factors influenced the effectiveness of virotherapy. Additionally, IgG antibodies against the virus were detected in two patients, indicating immune activation. Although preliminary, these findings underscore the need for more structured therapeutic protocols and studies involving larger animal cohorts and combination therapies, suggesting that NDV may represent an innovative and promising approach for the treatment of mammary neoplasms in dogs, contributing to the advancement of veterinary oncology.

Keywords: mammary tumors; oncology; virotherapy; Newcastle disease virus; NDV.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

Imagem 1 - Infiltrados celulares no microambiente tumoral.	25
Imagem 2 - <i>Hallmarks</i> do câncer.	27
Imagem 3 - Imunoedição do câncer.	28
Imagem 4 - Estrutura do VDN.	30
Imagem 5 - Fusão e replicação do VDN.	33
Imagem 6 - Características dos vírus oncolíticos.	35
Imagem 7 - Morte de células tumorais por diferentes vias e resposta.....	40
Imagem 8 - Ativação da via do IFN-I por vírus da doença de Newcastle.....	42
Imagem 9 - Via extrínseca e intrínseca de ativação de apoptose pela cepa VDN-AF2240.	43
Imagem 10 - A apresentação de antígenos resulta na transformação das células NK e na ativação dos macrófagos M1 após administração da cepa AF2240 do vírus da doença de Newcastle. .	45
Imagem 11 - Fatores de risco para tumores mamários caninos.....	54
Imagem 12 - Estratégias terapêuticas para cães com tumores.....	56
Imagem 13 - Características do vírus oncolítico ideal para uso veterinário.....	58

CAPÍTULO II

Image 1 - Cell viability analysis after 72 hours (resazurin-based assay) of PC-3 and PNT-2 cells treated with seven different viral concentrations of the La Sota strain of NDV.	113
Image 2 - Images of PC-3 xenografts in CAM to evaluate the efficacy of the La Sota strain of NDV.	115
Image 3 - Plots showing vascular density and vascular length density of PC-3 xenografts in CE CAM treated with the La Sota strain of NDV.	116
Image 4 - Graph showing IL-6 secretion in PC-3 xenografts within CE CAM, treated with the La Sota strain of NDV.....	117

CAPÍTULO III

Figura 1 - Avaliação da viabilidade celular após 24 e 48 horas em células CMT-U27 e MDCK tratadas com sete diferentes concentrações (tratamentos T1 a T7) da cepa La Sota do VDN. Significância se $p < 0,05$. A linha horizontal representa 50% de viabilidade.	136
Figura 2 - Cadelas tratadas com três infusões intravenosas da cepa La Sota do vírus da doença de Newcastle. A) Paciente 1, dia 58: ausência de metástases pulmonares visíveis radiograficamente, antes do início do tratamento. B) Paciente 1, dia 92: nódulo em mama	

torácica caudal direita; C) Paciente 1, dia 154, padrão intersticial estruturado que levou à suspeita de neoplasia primária e/ou metastática, abscesso ou granuloma. D) Paciente 2, dia 42: ausência de metástases pulmonares visíveis radiograficamente, antes do início do tratamento. E) Paciente 2, dia 147: nódulo em mama abdominal caudal direita. F) Paciente 2, dia 209: ausência de metástases pulmonares visíveis radiograficamente. LLD = posição laterolateral direita. 144

Figura 3 - Volume tumoral antes e após o tratamento com a cepa La Sota do VDN, em cadelas com neoplasias mamárias espontâneas, para avaliação da redução e progressão tumoral. M1: mama torácica cranial; M2: mama torácica caudal M3: mama abdominal cranial; M4: mama abdominal caudal; M5: mama inguinal AT: antes do tratamento; PT: posterior ao tratamento. Volumes tumorais e porcentagens referem-se a estatística descritiva..... 146

Figura 4 - Ensaio ELISA para a detecção de anticorpos IgG anti-cepa La Sota do vírus da doença de Newcastle em cadelas portadoras de neoplasias mamárias espontâneas tratadas com a cepa La Sota do VDN. Significância se $p < 0,05$; ns=não significativo. AT: antes do tratamento; DT: durante o tratamento; PT: posterior ao tratamento. 145

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III

Tabelas 1 - Eritrograma, leucograma, plaquetrograma e bioquímicos de cadelas portadoras de tumores mamários espontâneos, tratadas com a cepa La Sota do vírus da doença de Newcastle.	139
Tabelas 2 - Eventos adversos documentados durante e após o tratamento com infusões intravenosas da cepa La Sota do vírus da doença de Newcastle, em cadelas portadoras de neoplasias mamárias espontâneas, de acordo com o VCOG (Leblanc <i>et al.</i> , 2021).	140

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-DG - 2-desoxiglicose

4T1 - Células murinas de adenocarcinoma mamário

73T - Cepa do vírus da doença de Newcastle

aa - Aminoácidos

ADCC - Citotoxicidade celular dependente de anticorpos

AF2240 - Cepa do vírus da doença de Newcastle

AKBA - Ácido 3-Acetil-11-ceto-beta-boswéllico

ALT - Alanina aminotransferase

AMHA1 - Cepa do vírus da doença de Newcastle

AMJ13 - Células humanas de carcinoma mamário invasivo, de nenhum tipo especial, negativas para receptores de estrogênio e progesterona (ER- PR-)

AMN3 - Células murinas de adenocarcinoma mamário

AINE – Anti-inflamatório não estereoidal

Apaf-1 - Protease associada à apoptose 1

APC's - Células apresentadoras de antígenos

ARAC - Comitê Consultivo de Pesquisa Animal

AT - Antes do tratamento

ATP - Adenina trifosfato

BCRJ - Banco de células do Rio de Janeiro

bpm - Batimentos por minuto

BSA - Albumina de soro bovino

BT549 - Células humanas de carcinoma mamário ductal, triplo negativo (HER2- ER- PR-)

CAM - Membrana Cório-Alantoica

CAP - Complexo atrial prematuro

CCK-8 - Cell counting kit-8 (kit de contagem celular)

CDs - Células dendríticas

CD4+ Th1 - Linfócito T helper 1 / célula T helper 1

CE - Embrião de Frango

CHCM - Concentração de hemoglobina corpuscular média

CI - Intervalo de Confiança

CMT-U27 - Células caninas de carcinoma mamário

CO₂ - Dióxido de Carbono

CT - Citrato de tamoxifeno

CXCL10 - Ligante de quimiocina CXC 10

DAB - Diaminobenzidina

DAMPs - Padrões moleculares associados a danos

DE – Doença estável

DIE50 - Dose infectante de 50%

DP – Doença progressiva

DT - Durante o tratamento

ECG - Eletrocardiograma

ECO - Ecodopplercardiograma

EID - Dias de Incubação Embrionária

ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

EMEM - Eagle's minimum essential medium (meio mínimo essencial de Eagle)

ERBB1-3 - Família de Receptores do Fator de Crescimento Epidérmico

ERK/MAPK - Quinases Reguladas por Sinais Extracelulares/Quinases Ativadas por mitógenos

EUA - Estados Unidos da América

EV - Viabilidade Embrionária

F - Proteína de fusão

FA – Fosfatase alcalina

FADD - Domínio de morte associado ao Fas

Fas - Proteína pró-apoptótica

FDA - Administração de Alimentos e Medicamentos

FBS - Soro fetal bovino

Fosfo-p65 - forma fosforilada da subunidade p65 do complexo NF-kappaB

G-CSF - Fator estimulador de colônias de granulócitos

GFP - Proteína fluorescente verde

GGT - Gama-glutamil transferase

GM-CSF - Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

HAU - Unidades de hemaglutinação

HIF - Fator indutível por hipóxia

HIF-1 α - Fator indutível por hipóxia 1-alfa

Hitchner B1 - Cepa do vírus da doença de Newcastle

HLA-DR - Receptor de superfície celular de MHC II

HN - Hemaglutinina-neuraminidase

HRP - Peroxidase de rábano

HSV - Vírus herpes simples

HSV-1 - Vírus herpes simples tipo 1

HUJ - Cepa do vírus da doença de Newcastle

HOVET-UFU – Hospital veterinário da Universidade Federal de Uberlândia

IARC - Agência internacional de pesquisa sobre câncer

IC50 - Concentração Inibitória de 50 %

ICIs - Inibidores de checkpoints imunológicos

ICPI - Índice de patogenicidade intracerebral

IFNs - Interferons

IFN-I - Interferon do tipo I

IFN- α - Interferon alfa

IFN- α 2a - Interferon alfa-2a

IFN- β - Interferon beta

IFN- γ - Interferon gama

IgG – Imunoglobulina G

IL-12 - Interleucina-12

IL-2 - Interleucina-2

IL-6 - Interleucina-6

IL-8 - Interleucina-8

IR – intervalo de referência

IS – Índice de seletividade

JAK-STAT - Quinase Janus-Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição

kDa - Quilodaltons

L - Proteína polimerase grande

La Sota - Cepa do vírus da doença de Newcastle

LId – Linfonodo inguinal direito

LLD – laterolateral direita

LLE – laterolateral esquerda

M - Proteína da matriz

M1d – Mama torácica cranial direita

M1e - Mama torácica cranial esquerda

M2d - Mama torácica caudal direita

M2e - Mama torácica caudal esquerda

M3d - Mama abdominal cranial direita

M3e – Mama abdominal cranial esquerda

M4d - Mama abdominal cranial esquerda

M4e - Mama abdominal caudal esquerda

M5d – Mama inguinal direita

M5e – Mama inguinal esquerda

MCI - Morte celular imunogênica

MDA-MB-231 - Células humanas de carcinoma ductal invasivo, triplo negativo (HER2- ER- PR-)

MDCK - Madin-Darby Canine Kidney (linhagem celular de epitélio renal normal canino)

MDSCs - Células supressoras derivadas da linhagem mieloide

MEC - Matriz extracelular

MCF7 - Células humanas de carcinoma mamário invasivo, de nenhum tipo especial, positivas para receptores de estrogênio e progesterona (ER+ PR+)

MDCK - Células renais caninas Madin-Darby

MHC I - Complexo principal de histocompatibilidade de classe I

MHC II - Complexo principal de histocompatibilidade de classe II

ml - mililitros

MOMP - Permeabilização da membrana externa mitocondrial

MRUD - Mastectomia radical unilateral direita

MRUD/OH – Mastectomia radical unilateral direita + ovariectomia

MTT - Teste de Viabilidade Celular MTT

NC – Não castrada

NCI - National Cancer Institute

NDV-MLS - Cepa NDV

NF-κB - Fator nuclear kappa B

NK - Células natural killers

NKp46 - Proteína p46 relacionada à célula natural killer

nm - Nanômetros

NO - Óxido nítrico

NP / N - Proteína do nucleocapsídeo / nucleoproteína

nt - Nucleotídeos

OPD - O-fenilenodiamina dihidrocloreto

P - Fosfoproteína

P1 – Paciente 1

P2 – Paciente 2

P3 – Paciente 3

P38/MAPK - p38 quinase ativada por mitógeno

PAAF - Punção aspirativa por agulha fina

PAF - Punção por agulha fina

PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos

PARP - Poli (ADP-ribose) polimerase

PBMCs - Células mononucleares do sangue periférico

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

PBS-T - Solução salina tamponada com fosfato e tween

PC - Controle Positivo

PC-3 - Células de Câncer de Próstata Humana

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PD-L1 - Receptor de morte programada 1

PID - Pós-Infectado por 4 Dias

PIH - Pré-Infectado por 4 Horas

PNT-2 - Células Normais de Próstata Humana

PT - Posterior ao tratamento

PUMA - Modulador de apoptose regulado positivamente por p53

RC – Resposta completa

RIG-1 - Gene indutor de ácido retinóico 1

RNAm - RNA mensageiro

RNP - Complexo ribonucleoproteico

ROS - Espécies reativas de oxigênio

RP – Resposta parcial

Ringer lactato - Solução de Ringer lactato

RPMI - Instituto Memorial Roswell Park

SCC-25 - Carcinoma de Células Escamosas Humanas

SG - Sobrevida global

SI - Sistema imune

SLD - Sobrevida livre de doença

SPF – Livre de patógenos específicos

SRD – Sem raça definida

TAAs - Antígenos associados a tumores

TAMs - Macrófagos associados ao tumor

TCR - Receptor de células T

TILs - Linfócitos infiltrantes de tumor

TLR - Receptores extracelulares tool-like

TMCs - Tumores mamários caninos

TME - Microambiente tumoral

TNF - Fator de necrose tumoral

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

TNM – Sistema de classificação baseado no tamanho do tumor, metástase do linfonodo e metástase à distância

TR-DPP - Teste rápido por duplo plano paralelo

TRAIL - Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF

Tregs - Células T reguladoras

UFP – Unidades formadoras de placa

Ulster - Cepa do vírus da doença de Newcastle

US - Ultrassonografia

UTI – Unidade de tratamento intensivo

V4-UPM - Cepa do vírus da doença de Newcastle

VCM – Volume corpuscular médio

VD – ventro dorsal

VDN - Vírus da doença de Newcastle

VDN-GFP - Vírus da doença de Newcastle modificado para expressar a proteína fluorescente verde

VOs - Vírus oncolíticos

VPM - Volume médio de plaquetas

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES GERAIS	22
1.INTRODUÇÃO.....	22
2.OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos específicos.....	24
3.REVISÃO DA LITERATURA.....	25
3.1 O microambiente tumoral.....	25
3.2 <i>Hallmarks</i> do câncer.....	26
3.2.1 <i>Evasão do SI: um hallmark central</i>	27
3.3 Imunoedição do câncer.....	28
3.4 O vírus de Newcastle (VDN).....	29
3.4.1 <i>Overview</i>	29
3.4.2 <i>Genoma</i>	30
3.4.2.1 <i>Proteína do nucleocapsídeo (NP) ou nucleoproteína (N)</i>	30
3.4.2.2 <i>Fosfoproteína (P)</i>	31
3.4.2.3 <i>Proteína da matriz (M)</i>	31
3.4.2.4 <i>Proteína de fusão (F)</i>	31
3.4.2.5 <i>Hemaglutinina-neuraminidase (HN)</i>	32
3.4.2.6 <i>Proteína polimerase grande (L)</i>	32
3.4.3 <i>Patogenicidade e virulência</i>	32
3.4.4 <i>Fusão e replicação viral do VDN</i>	33
3.5 Terapias anticâncer com o uso de vírus (viroterapia oncolítica)	34
3.5.1 <i>Viroterapia com VDN</i>	36
3.5.1.1 <i>Cepas do VDN</i>	37
3.5.1.2 <i>Vantagens do VDN</i>	38
3.5.1.3 <i>Potencial zoonótico do VDN</i>	39

3.6 Mecanismos do VDN para indução de destruição da célula tumoral e resposta imune antitumoral.....	39
3.6.1 <i>Resposta imune inata</i>	40
3.6.1.1 <i>Indução de MCI</i>	40
3.6.1.1.1 Morte celular pela via p38 quinase ativada por mitógeno (P38/MAPK)	41
3.6.1.1.2 Apoptose.....	43
3.6.1.2 <i>Liberação de antígenos</i>	44
3.6.1.3 <i>Células NK e macrófagos na resposta imune antitumoral</i>	44
3.6.2 <i>Resposta imune adaptativa</i>	46
3.6.2.1 <i>Ativação de células T</i>	46
3.7 O uso do VDN no câncer de mama humano e murino.....	46
3.7.1 <i>Pesquisas in vitro</i>	47
3.7.2 <i>Pesquisas utilizando modelos murinos in vivo</i>	49
3.7.3 <i>Ensaio clínico e relato de caso</i>	50
3.8 Segurança e eventos adversos (EA) da viroterapia com VDN em humanos.....	51
3.8.1 <i>Tolerabilidade do paciente à viroterapia com o VDN</i>	51
3.8.2 <i>Efeitos adversos à viroterapia com o VDN</i>	51
3.9 Tumores mamário caninos (TMCs).....	53
3.9.1 <i>Epidemiologia</i>	53
3.9.2 <i>Classificação histológica e grau histológico</i>	54
3.9.3 <i>Estadiamento clínico</i>	55
3.9.4 <i>Fatores prognósticos e preditivos</i>	55
3.9.5 <i>Tratamentos</i>	55
4.0 <i>Viroterapia para cães com câncer</i>	57
4.0.1 <i>Viroterapia com o uso do VDN em modelos caninos</i>	58
4.0.1.1 <i>Uso do VDN como adjuvante no tratamento de TMCs</i>	60
4.0.1.2 <i>Segurança e eventos adversos da viroterapia com vírus da doença de Newcastle em animais</i>	61

REFERÊNCIAS	63
CAPÍTULO II – Evaluation of effect of Newcastle disease virus (La Sota strain) in human prostate tumor cell line using the chicken embryo model	106
Abstract.....	107
Introduction	107
Material and methods	108
Statistical analysis	113
Results	113
Discussion.....	117
Conclusions	119
References	120
CAPÍTULO III – Efeito oncolítico da cepa La Sota do vírus da doença de Newcastle em células CMT-U27 e em cadelas com carcinomas mamários: um estudo clínico.....	125
Resumo	125
Introdução	126
Materiais e métodos.....	127
Análises estatísticas	135
Resultados e Discussão.....	136
Conclusões.....	148
REFERÊNCIAS	150
APÊNDICE	193
CAPÍTULO IV – CONSIDERAÇÕES FINAIS	194

CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

O microambiente tumoral (TME) é crucial para a resposta terapêutica dos tumores. Tumores "quentes", com linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) e expressão de Receptor de morte programada 1 (PD-L1), respondem melhor às terapias (Hegde; Karanikas; Evers, 2016), enquanto tumores "frios", com discreta infiltração de células inflamatórias, apresentam respostas subótimas (Martini *et al.*, 2020). Abordagens como a viroterapia oncolítica, utilizando vírus oncolíticos (VOs), têm mostrado potencial para transformar tumores "frios" em "quentes" (Gujar; Pol; Kroemer, 2018). A cepa La Sota do vírus da doença de Newcastle (VDN) possui capacidades oncolíticas promissoras (Kalyanasundram *et al.*, 2018; Schirmacher, 2015).

Os *hallmarks* do câncer, descritos por Hanahan e Weinberg, incluem a desregulação do metabolismo celular e a evasão do sistema imune (SI) (Hanahan; Weinberg, 2011; Hanahan, 2022). A função do SI na resistência tumoral é debatida, mas a incidência de câncer em imunocomprometidos sugere um papel crucial (Hanahan; Weinberg, 2011; Vajdic; Van Leeuwen, 2009). A imunoedição do câncer envolve fases de eliminação, equilíbrio e escape, com o tumor eventualmente escapando do controle imunológico (Restifo; Smyth; Snyder, 2016).

A imunoterapia tem avançado desde os anos 90 (Bommareddy; Shettigar; Kaufman, 2018; Lohmueller; Finn, 2017) e diversos estudos confirmaram o potencial da viroterapia oncolítica (Duffy; Fisher; Seymour, 2017; Tap *et al.*, 2016).

O vírus da doença de Newcastle (sigla VDN) pertence a espécie *Avian orthoavulavirus 1*, sendo a cepa La Sota uma cepa vacinal, não considerada como doença de Newcastle por ser de baixa patogenicidade (OIE, 2012)

Estudos pré-clínicos mostram que a cepa La Sota do VDN mata seletivamente células tumorais e estimula uma resposta imune antitumoral, tanto inata quanto adaptativa, induzindo morte celular imunogênica (MCI) através de várias vias (Burke *et al.*, 2020; Kan *et al.*, 2021; Keshavarz *et al.*, 2020; Song *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2024; Zhan *et al.*, 2020).

O câncer de mama, sendo uma das principais causas de morte por câncer em mulheres, tem mostrado respostas promissoras à viroterapia com a cepa La Sota do VDN (Al-Ziaydi *et al.*, 2020; Laurie *et al.*, 2006; Pecora *et al.*, 2002). Além disso, existem dados extensivos sobre a segurança da cepa La Sota do VDN em terapia oncolítica, com cepas vacinais bem toleradas em humanos (Lam *et al.*, 2011) e baixa toxicidade (Lam *et al.*, 2011; Nelson, 1999).

Já na medicina veterinária, tumores mamários caninos (TMCs) são comuns e aproximadamente metade são malignos, tornando a análise histopatológica essencial para estratégias terapêuticas eficazes (Cassali *et al.*, 2020). Posto isso, diversas opções de tratamento estão disponíveis para TMCs (Cassali *et al.*, 2011; Mpekris *et al.*, 2022; Nosalova *et al.*, 2024).

A cepa La Sota do VDN apresenta características de um vírus oncolítico ideal, mostrando-se um candidato promissor para o tratamento de variados tipos de cânceres em humanos e caninos, incluindo neoplasias mamárias. Estudos destacam a eficiência da cepa La Sota do VDN em modelos de tumor animal, induzindo morte celular por apoptose e redução da sobrevivência celular (Rajmani *et al.*, 2011; Sánchez *et al.*, 2016). Contudo, mais pesquisas são necessárias para avaliar a eficácia dos VOs no tratamento de neoplasias em animais (Bilgiç; Dokuzeylül; Or, 2022; Nosalova *et al.*, 2024).

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos oncolíticos da cepa La Sota do VDN em culturas de células tumorais caninas e humanas, em xenoenxertos usando o embrião de galinha como modelo e em cadelas com tumores mamários.

2.2 Objetivos específicos

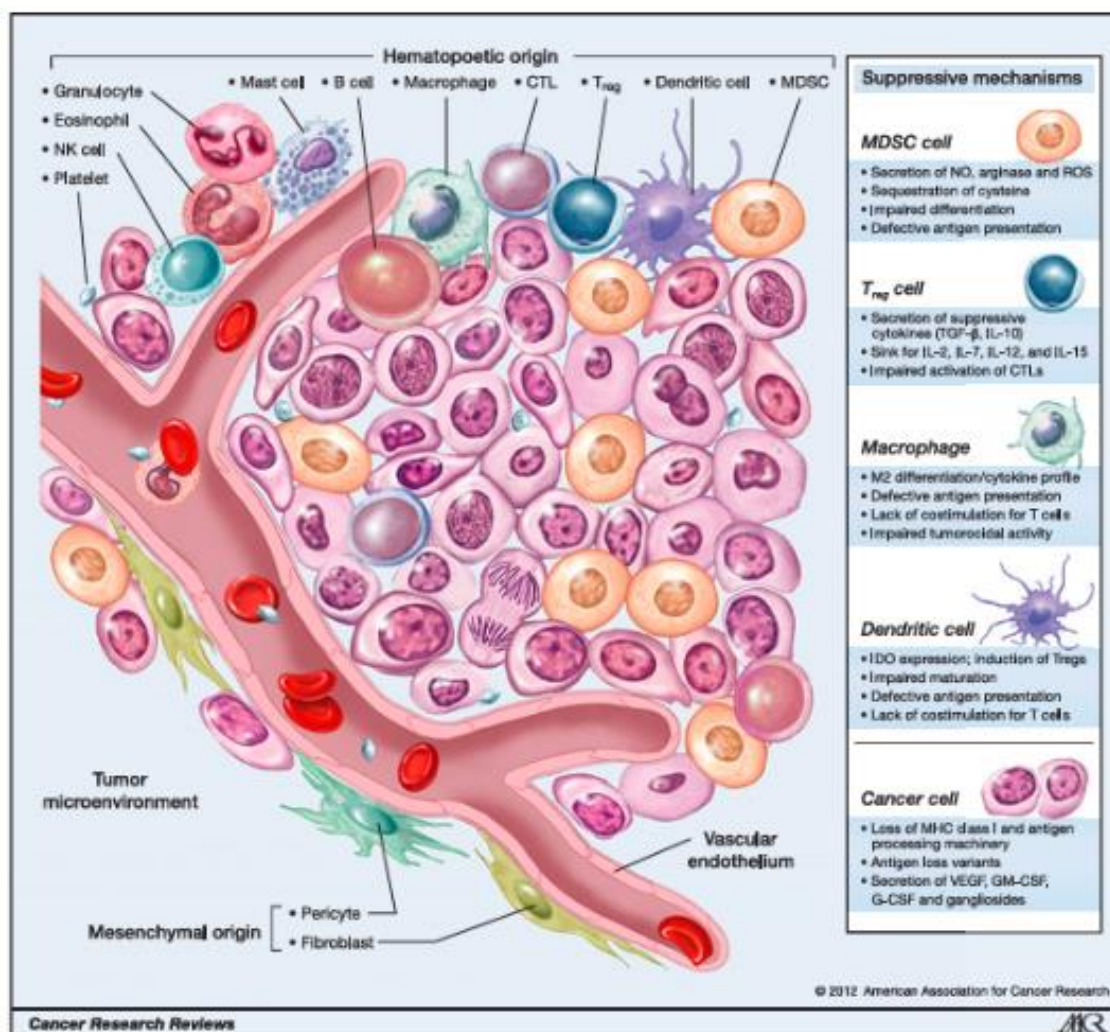
(I) Avaliar *in vitro* a eficácia oncolítica da cepa La Sota do VDN em células de carcinoma mamário canino CMT-U27 e células de adenocarcinoma prostático humano PC-3, observando a viabilidade celular. (II) Investigar *ex ovo* os efeitos oncolíticos da cepa La Sota do VDN em xenoenxertos de células de adenocarcinoma prostático humano PC-3, avaliando inibição, regressão, angiogênese e liberação de citocinas. (III) Acompanhar *in vivo* o efeito terapêutico da cepa La Sota do VDN, administrada por via intravenosa, em cadelas portadoras de carcinomas mamários espontâneos.

3.REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O microambiente tumoral

O TME (Imagem 1) é formado por diversos tipos celulares, entre eles, as células neoplásicas, endoteliais, inflamatórias e fibroblásticas (Kerkar; Restifo, 2012; Martini *et al.*, 2020).

Imagem 1 - Infiltrados celulares no microambiente tumoral.



Fonte: Kerkar; Restifo (2012).

O TME pode exercer uma função fundamental na resposta terapêutica. Os tumores ‘quentes’, caracterizados por presença de atividade antitumoral (Martini *et al.*, 2020), presença de TILs e expressão do receptor PD-L1 (receptor de morte programada 1) em células cancerosas, tendem a responder melhor às terapias (Hegde; Karanikas; Evers, 2016). No entanto, os tumores ‘frios’ são considerados não inflamados: são pouco infiltrados por células

do SI (Martini *et al.*, 2020), têm baixa expressão de neoantígenos, baixa expressão de apresentadores de antígenos como o MHC I (complexo principal de histocompatibilidade de classe I) e mal expressam PD-L1 (Hegde; Karanikas; Evers, 2016). Consequentemente, têm menor resposta aos tratamentos (Martini *et al.*, 2020).

Neste contexto, tumores 'frios' como os ovarianos, pancreáticos, prostáticos, entre outros, exibem respostas terapêuticas subótimas (Martini *et al.*, 2020). Além desses, historicamente, o câncer de mama é visto como um tumor imunologicamente 'frio', caracterizado por uma infiltração limitada de células T (Semiglazov *et al.*, 2022)

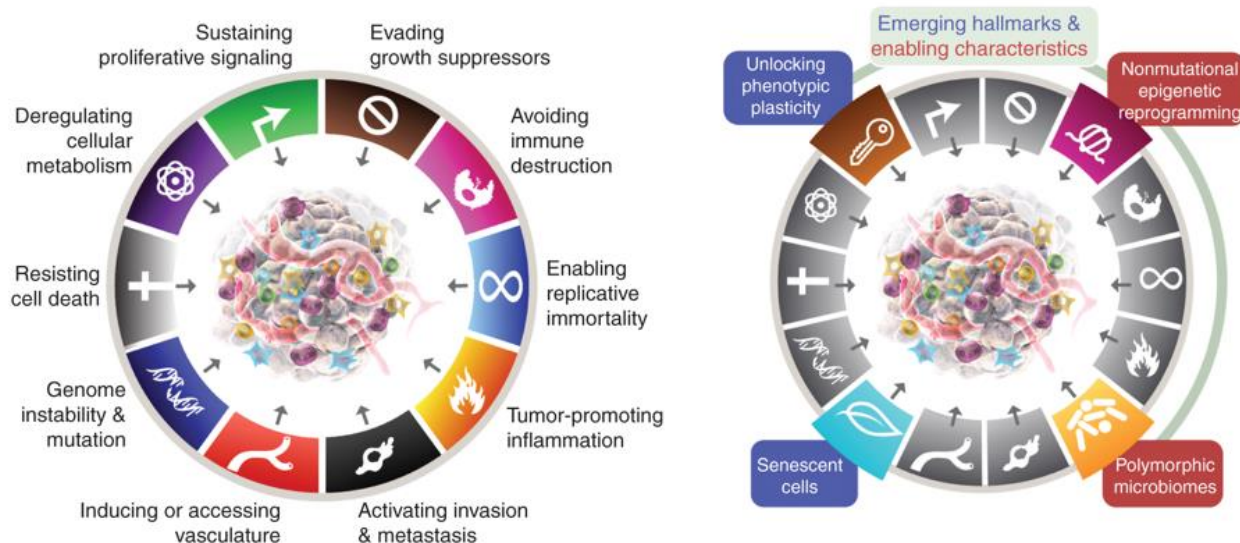
Diante desse cenário, diversas abordagens têm sido exploradas para converter tumores 'frios' em 'quentes' (Martini *et al.*, 2020). A viroterapia oncolítica, utilizando VOs, desempenha um papel crucial nesse processo. Em tumores 'quentes', os VOs intensificam a resposta imune antitumoral já existente; em tumores 'frios', eles provocam um influxo de células imunes para o TME, como TILs, convertendo-o em um tumor 'quente' (Martini *et al.*, 2020) e adequando-o para receber outros tratamentos imunoterapêuticos (Gujar; Pol; Kroemer, 2018)

O VDN possui, além da capacidade de induzir a morte de células cancerosas, potencial em transformar tumores 'frios' em 'quentes', ou seja, de converter um TME imunossupressor em pró-inflamatório (Kalyanasundram *et al.*, 2018; Schirmacher, 2015).

3.2 *Hallmarks* do câncer

Os *hallmarks* do câncer, ou seja, as características tumorais distintas e complementares que permitem o desenvolvimento biológico do câncer e a formação de metástases, foram propostas por Douglas Hanahan e Robert A. Weinberg, compreendendo oito *hallmarks* registrados atualmente (Hanahan; Weinberg, 2011). Na versão mais recente deste conceito (Hanahan, 2022), a desregulação do metabolismo celular e a evasão do SI que, inicialmente foram classificados como "*hallmarks* emergentes", estão incluídos na representação atual (Hanahan, 2022) (Imagem 2).

Imagem 2 - *Hallmarks* do câncer.



Fonte: Hanahan (2022).

3.2.1 Evasão do SI: um *hallmark* central

A função que o SI desempenha, tanto na resistência, quanto na erradicação de tumores incipientes, neoplasias em estágio avançado e micrometástases, ainda não está totalmente esclarecida, necessitando de mais estudos (Hanahan; Weinberg, 2011).

O aumento considerável de alguns tipos de câncer em pessoas imunocomprometidas, parece estar associado a um sistema de monitoramento imunológico defeituoso (Vajdic; Van Leeuwen, 2009). Entretanto, a maior parte desses tumores são de origem viral, sugerindo que o controle de seu desenvolvimento se dá, em parte, através da eliminação de células infectadas por vírus. Logo, essas informações não elucidam a possível função do SI em restringir o desenvolvimento de mais de 80 % de neoplasias não virais (Hanahan; Weinberg, 2011).

Apesar disso, nos últimos anos, trabalhos em epidemiologia clínica e pesquisas com camundongos geneticamente modificados, sugerem que o SI atua consideravelmente para impedir a formação e a progressão tumoral (Hanahan; Weinberg, 2011).

Diversos autores observaram maior frequência e / ou crescimento de tumores induzidos por carcinógenos, em camundongos imunodeficientes, modificados geneticamente, quando comparados aos animais-controle imunocompetentes. Essencialmente, a deficiência no desenvolvimento ou na função dos linfócitos CD8⁺ (linfócitos T citotóxicos), linfócitos CD4⁺ Th1 (linfócitos T *helper* 1), ou células NK, ocasionou aumento na incidência das neoplasias. Ademais, os pesquisadores relataram maior suscetibilidade para progressão tumoral, em camundongos com imunodeficiência combinada de células T e NK. Por conseguinte, os dados

indicaram que o SI inato e adaptativo são competentes para realizar vigilância imunológica e erradicação neoplásica, ao menos em alguns modelos experimentais (Kim; Emi; Tanabe, 2007; Teng *et al.*, 2008).

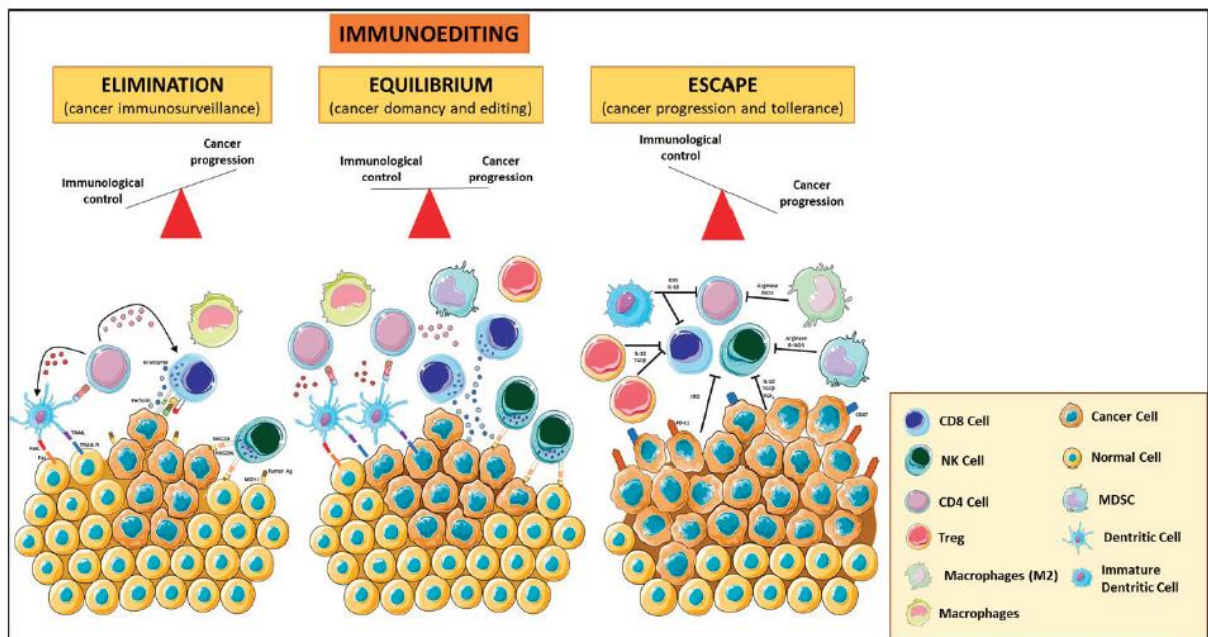
Em contrapartida, outras pesquisas no campo da epidemiologia clínica humana apoiam a existência de respostas imunológicas antitumorais em determinados tipos de câncer (Bindea *et al.*, 2010; Ferrone; Dranoff, 2010; Nelson, 2008).

Outro ponto diz respeito à imunoeedição do câncer. Na fase de escape tumoral, elementos do SI são bloqueados por células imunossupressoras, por liberação de citocinas (Martini *et al.*, 2020).

3.3 Imunoeedição do câncer

O mecanismo de escape do SI pelo tumor é chamado de imunoeedição (Martini *et al.*, 2020) (Imagem 3). Este processo se caracteriza pelas fases de eliminação/imunovigilância, equilíbrio/edição e escape (Martini *et al.*, 2020; Restifo; Smyth; Snyder, 2016).

Imagem 3 - Imunoeedição do câncer.



Fonte: Martini *et al.* (2020).

Na fase de imunovigilância (Imagem 3), comum no início do crescimento tumoral, as células cancerosas intensamente antigênicas são reconhecidas pelo SI inato e adaptativo e posteriormente eliminadas (Martini *et al.*, 2020; Restifo; Smyth; Snyder, 2016). Na fase de equilíbrio (Imagem 3), a neoplasia e o SI adaptativo coexistem; ainda assim, células tumorais

são continuamente destruídas (Martini *et al.*, 2020; Restifo; Smyth; Snyder, 2016). Na última etapa da imunoeedição, na fase de escape (Imagem 3), as células tumorais têm pouca expressão antigênica, há liberação de citocinas imunossupressoras, presença de células imunossupressoras como T reguladoras (Tregs), macrófagos associados ao tumor (TAMs), como macrófagos M2 e células supressoras derivadas da linhagem mieloide (MDSCs), o que favorece a proliferação celular e o surgimento de metástases (Martini *et al.*, 2020; Restifo; Smyth; Snyder, 2016).

3.4 O vírus de Newcastle (VDN)

3.4.1 Overview

Em 1927, o VDN foi isolado pela primeira vez em galinhas domésticas, na cidade de Newcastle, Inglaterra (Nelson, 1999). Desde a década de 50 ele é usado com sucesso como uma vacina atenuada em galinhas (Czeglédi *et al.*, 2006) e os VDNs recombinantes que expressam a proteína H do vírus da cinomose canina e a glicoproteína do vírus da raiva apresentaram boa imunogenicidade em animais (Ge *et al.*, 2011, 2015).

Além disso, o VDN tem sido estudado com vetor para a fabricação de vacinas para humanos. A vacina contra a COVID-19 que expressa a proteína spike do SARS-CoV-2 tem apresentado resultados promissores (Fulber; Kamen, 2022). Já o projeto para a fabricação de uma vacina experimental, a Butanvac, elaborada pelo Instituto Butantan em São Paulo, Brasil, foi descontinuada por não atingir o desfecho esperado após o ensaio clínico de fase II (Instituto Butantan, 2024)

O VDN, também conhecido como APMV-1 (Paramixovírus aviário 1) (Dimitrov *et al.*, 2016), pertence à ordem *Mononegavirales*, família *Paramyxoviridae*, gênero *Avulavirinae* (ICTV, 2011).

O vírus é pleomórfico (Ganar *et al.*, 2014) e possui formato esférico (Lamb; Parks, 2007). O capsídeo é helicoidal envelopado por dupla camada lipídica (Lamb; Parks, 2007; Villar; Barroso, 2006) Mede entre 100 e 500 nm (nanômetros) (Martini *et al.*, 2020) e possui de 200 a 300 nm de diâmetro (Ganar *et al.*, 2014). Possui distribuição global e infecta aves selvagens, domésticas e peridomésticas (Dimitrov *et al.*, 2016).

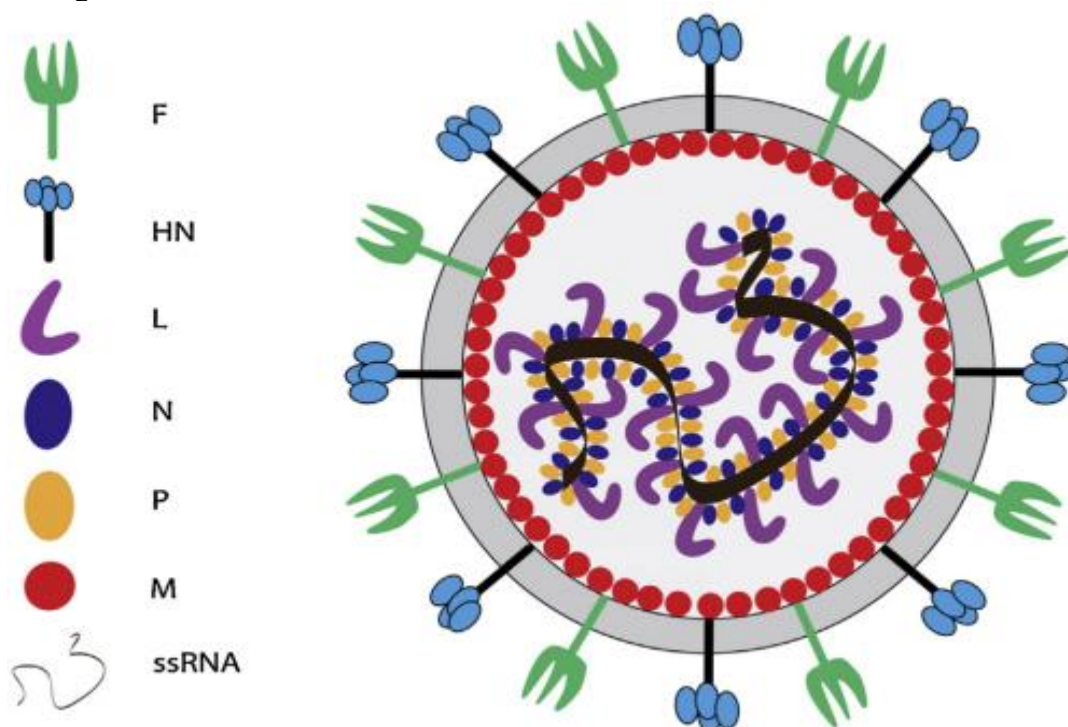
Apesar da patogenicidade em humanos (Ganar *et al.*, 2014), infecções nessa espécie são extremamente raras e cepas altamente virulentas podem causar apenas sintomas leves como conjuntivite, tosse, febre moderada e sintomatologia gripal (Ganar *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2019). Ademais, não há relatos na literatura sobre transmissão humano-humano (Sanchez. *et al.*, 2014).

3.4.2 Genoma

O ácido nucleico do VDN é um RNA fita simples de polaridade negativa (Lamb; Parks, 2007; Villar; Barroso, 2006). O genoma é do tipo não segmentado (Lamb; Parks, 2007). Por análise filogenética recente, os VDNs são divididos em duas classes. A classe I possui apenas um genótipo (genótipo 1), enquanto a classe II abrange 21 genótipos diferentes (I–XXI) (Dimitrov et al., 2019).

O genoma do VDN codifica, no mínimo, seis genes estruturais (Imagem 4) (Chambers et al., 1986).

Imagem 4 - Estrutura do VDN.



Fonte: Ganar *et al.* (2014).

3.4.2.1 Proteína do nucleocapsídeo (NP) ou nucleoproteína (N)

É constituída por 489 aa (aminoácidos) e pesa 55 kDa (quilodaltons). É integrante do RNP (complexo ribonucleoproteico), juntamente com as proteínas P e L (Lamb; Parks, 2007), formando a unidade de replicação viral (Liu *et al.*, 2019; Villar; Barroso, 2006)

3.4.2.2 Fosfoproteína (P)

É formada por 395 aa e pesa de 50 a 55 kDa. Possui função essencial na transcrição e na replicação viral (Dortmans *et al.*, 2011; Villar; Barroso, 2006).

À exceção dos demais genes, o gene P tem capacidade de codificar três proteínas (P, V e W) através de um processo chamado de edição de RNA (Lamb; Parks, 2007; Miller; Decanini; Afonso, 2010).

Nas células de galinha, a proteína V tem a função de inibir a resposta do interferon e a apoptose. No entanto, essa função de mecanismo de escape é observada apenas em aves e não em células de mamíferos. Por essa razão, acredita-se que a proteína V contribua para a gama limitada de hospedeiros do VDN, sendo uma das principais razões pela qual o VDN não é virulento em células normais de mamíferos (Park *et al.*, 2003).

3.4.2.3 Proteína da matriz (M)

É constituída por 364 aa e pesa aproximadamente 40 kDa (Chambers *et al.*, 1986). Fica localizada abaixo da membrana viral (Villar; Barroso, 2006) e, sugere-se, que seja a encarregada de manter o formato esférico do nucleocapsídeo (Mebatsion; Weiland; Conzelmann, 1999). Entre suas funções estão o controle da síntese de RNA viral e a montagem do vírion na célula hospedeira (Peeples; Bratt, 1984; Villar; Barroso, 2006).

3.4.2.4 Proteína de fusão (F)

Participa da constituição do envelope externo do VDN como uma glicoproteína de superfície (Villar; Barroso, 2006).

Desempenha uma função relevante na virulência das cepas virais (Panda *et al.*, 2004; Römer-Oberdörfer *et al.*, 2003), intermediando a fusão do vírus com a membrana da célula hospedeira (Villar; Barroso, 2006).

O potencial de infecciosidade do VDN depende, indispensavelmente, da clivagem da proteína F (Panda *et al.*, 2004; Peeters *et al.*, 1999; Samal *et al.*, 2011). O polipeptídeo F0 inativo é quebrado em F1 e F2, convertendo-o em um vírus infeccioso (Yaacov *et al.*, 2008) com capacidade de fusão celular para penetração do genoma na célula hospedeira (Leeuw *et al.*, 2005; Yaacov *et al.*, 2008) e formação de sincícios (Li *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2017). A proteína HN contribui com a função de F (Morrison, 2003).

3.4.2.5 Hemaglutinina-neuraminidase (HN)

É uma glicoproteína de superfície do envelope do VDN, pesa 74 kDa (Villar; Barroso, 2006) e reconhece receptores de Sias em células hospedeiras (Sun *et al.*, 2015). Ela é coexpressada com a proteína F e ambas atuam na fusão e entrada do nucleocapsídeo viral na célula (Ganar *et al.*, 2014). Assim como F, também tem função essencial na formação de sincícios (Li *et al.*, 2004).

3.4.2.6 Proteína polimerase grande (L)

Representa a maior proteína do VDN. É constituída por 2.204 aa e pesa 250 kDa (Lamb; Parks, 2007). Juntamente com a proteína P, no complexo P-L, forma o RNA polimerase (Lamb; Parks, 2007) e realiza a transcrição do RNAm viral (RNA mensageiro) (Ganar *et al.*, 2014).

3.4.3 Patogenicidade e virulência

A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2012) classificou as cepas do VDN conforme sua patogenicidade e virulência e que são passíveis de notificação oficial. O ICPI (índice de patogenicidade intracerebral) é o teste padrão-ouro, *in vivo*. Já a virulência é estipulada pelo local de clivagem da proteína F, com base na estrutura de aminoácidos. Por conseguinte, as cepas do VDN são classificadas em três patótipos (Liu, 2014).

Os vírus lentogênicos possuem baixa patogenicidade (ICPI < 0,7) (Dimitrov *et al.*, 2016), baixa virulência (a estrutura dos aminoácidos no local de clivagem F é monobásica) (Glickman *et al.*, 1988) e são pouco tóxicos ou atóxicos (Liu, 2014). Normalmente, causam doença subclínica em aves (Dimitrov *et al.*, 2016).

Os vírus mesogênicos possuem patogenicidade moderada (ICPI 0,7 – 1,5) (Dimitrov *et al.*, 2016), moderada virulência (a estrutura dos aminoácidos no local de clivagem F é polibásica) (Glickman *et al.*, 1988) e são moderadamente tóxicos (Liu, 2014). Geralmente causam sinais clínicos, porém não são letais em galinhas (Dimitrov *et al.*, 2016).

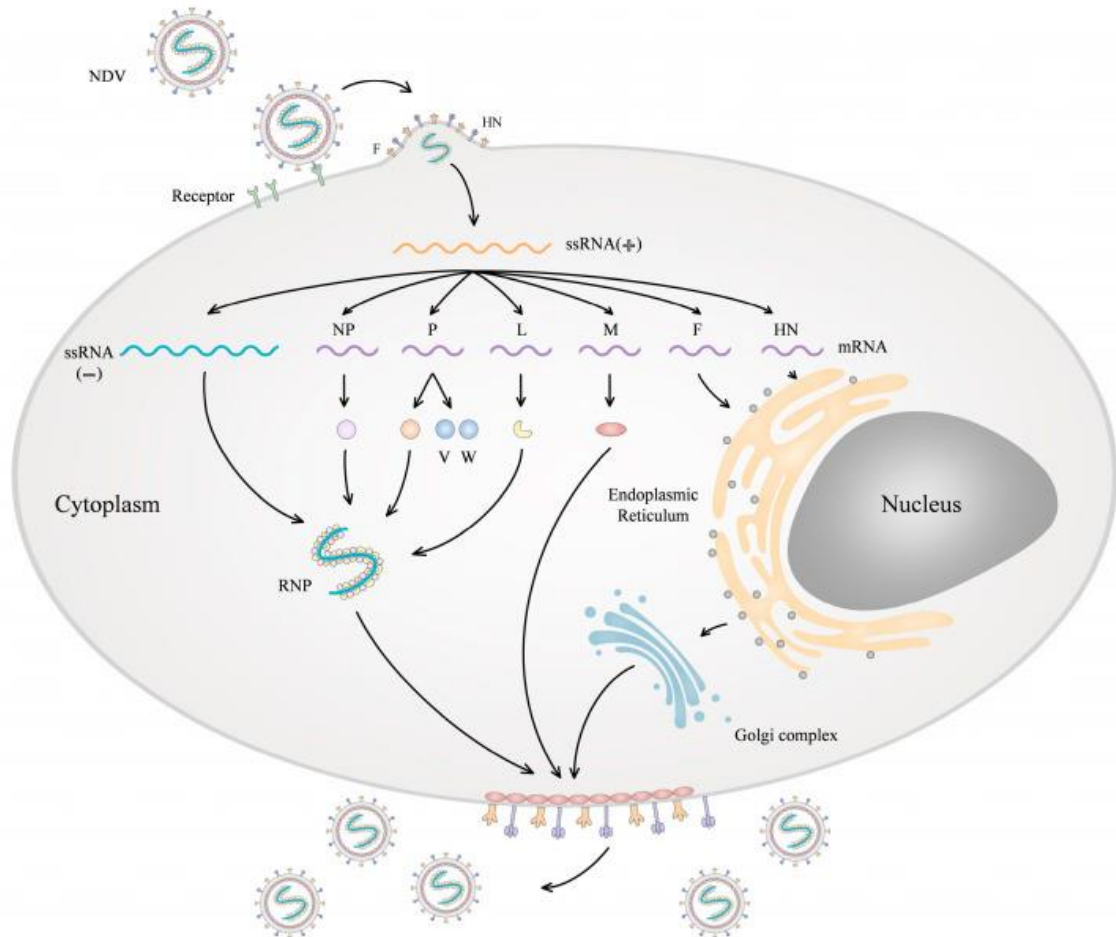
Os vírus velogênicos possuem alta patogenicidade (ICPI > 1,5) (Dimitrov *et al.*, 2016), alta virulência (a estrutura dos aminoácidos no local de clivagem F é polibásica) (GLICKMAN *et al.*, 1988) e são fortemente tóxicos (Liu, 2014). Causam sintomatologia respiratória grave e mortalidade em aves (Dimitrov *et al.*, 2016).

Embora haja poucas evidências, cepas do VDN de baixa virulência podem sofrer mutações pontuais e se transformar em fenótipos virulentos (Alexander, 2011).

3.4.4 Fusão e replicação viral do VDN

O VDN se funde à célula hospedeira para a replicação viral e a formação de vírions (forma infectante) (Imagem 5).

Imagem 5 - Fusão e replicação do VDN.



Fonte: Yang *et al.* (2024).

A glicoproteína de superfície viral HN pode se ligar ao receptor de ácido siálico da célula hospedeira, propiciando a interação de HN com a proteína de superfície viral F. A mudança conformacional de F resulta na fusão do envelope viral com a membrana plasmática da célula, desencadeando a entrada do nucleocapsídeo do VDN no citoplasma celular (Dortmans *et al.*, 2011; Ganar *et al.*, 2014). Esta primeira fase ocorre em uma ampla variedade de tipos celulares (Yang *et al.*, 2024).

Além disso, o VDN pode entrar nas células através de micropinocitose (Tan *et al.*, 2016), endocitose dependente de RhoA (El-Sayed; Harashima, 2013) ou mediada por clatrina (Tan *et al.*, 2016).

Na região citoplasmática, a proteína M se desprende do complexo RNP. O complexo de proteínas P-L forma o RNA polimerase que inicia a transcrição do RNA viral (Dortmans *et al.*, 2011). O RNA de sentido negativo é transcrito em um molde antígenômico de polaridade positiva (Dortmans *et al.*, 2011; Ganar *et al.*, 2014) e, posteriormente, é traduzido para sintetizar um novo RNA de sentido negativo e novas proteínas estruturais (Ganar *et al.*, 2014; Molouki; Peeters, 2017). Um novo nucleocapsídeo é formado pelo RNA recém-sintetizado envolvido pelas proteínas NP, P e L; o nucleocapsídeo é montado com a proteína M e as glicoproteínas de superfície HN e F. A progênie viral é então liberada da célula hospedeira por brotamento (Cuadrado-Castano *et al.*, 2015a; Ganar *et al.*, 2014). Por fim, a proteína HN tem a capacidade de eliminar resíduos de ácido siálico dos vírions recém-formados, evitando sua aglomeração e facilitando a propagação do vírus nos tecidos infectados (Iorio *et al.*, 2001).

Esta segunda fase é restrita às células tumorais de hospedeiros não aviários, devido à inibição da replicação viral em células normais por mecanismos de defesa que envolvem o interferon tipo I (IFN-I) (Yang *et al.*, 2024).

3.5 Terapias anticâncer com o uso de vírus (viroterapia oncolítica)

A imunoterapia ganhou destaque a partir dos anos 90 e diferentes técnicas têm sido desenvolvidas no intuito de induzir forte resposta imune antitumoral em pacientes oncológicos. Dentre estas abordagens terapêuticas inclui-se vacinas, administração de anticorpos monoclonais contra antígenos tumorais, transferência adotiva de linfócitos T, administração de anticorpos como ICIs (inibidores de *checkpoints* imunológicos) e VOs (BOMMAREDDY; SHETTIGAR; KAUFMAN, 2018; LOHMUELLER; FINN, 2017).

Desde a década de 50, há relatos na literatura de pessoas com câncer naturalmente infectadas por vírus, que apresentaram alguma resposta antitumoral positiva (BIERMAN *et al.*, 1953; BLUMING; ZIEGLER, 1971; GROSS, 1971; PELNER; FOWLER; NAUTS, 1958).

Os vírus nativos ou geneticamente modificados são particularmente promissores e vantajosos na terapia contra o câncer, por sua especificidade em destruir células tumorais e preservar células normais (Li *et al.*, 2020; Martini *et al.*, 2020) e por sua capacidade de desencadear no paciente uma forte resposta imunológica antitumoral sistêmica e potencialmente duradoura (Martini *et al.*, 2020).

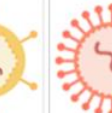
Durante a transformação em células cancerígenas, muitos componentes essenciais para a defesa antiviral inata podem se tornar defeituosos ou suprimidos, o que torna essas células mais suscetíveis a diferentes cepas de vírus em comparação com células não transformadas. As

células cancerígenas podem apresentar menor capacidade de responder à estimulação antiviral promovida por interferons (IFNs) ou fator de necrose tumoral (TNF) (Bell; McFadden, 2014).

Diversos estudos pré-clínicos e clínicos relataram habilidades antineoplásicas promissoras para a viroterapia oncolítica. Ademais, os VOs demonstraram toxicidade substancialmente menor que as quimioterapias (Duffy; Fisher; Seymour, 2017; Tap *et al.*, 2016).

Atualmente, há dez tipos de vírus amplamente testados em viroterapia oncolítica (Lin; Shen; Liang, 2023) (Imagem 6).

Imagem 6 - Características dos vírus oncolíticos.

	Herpesvirus	Adenovirus	Vaccinia virus	Reovirus	Coxsackievirus	Seneca Valley virus	Poliovirus	Measles virus	Newcastle disease virus	Vesicular stomatitis virus
Model										
Genome	dsDNA 150 kb	dsDNA 36 kb	dsDNA 190 kb	dsRNA 123 kb	ss(+)RNA 28 kb	ss(+)RNA 7 kb	ss(+)RNA 7.5 kb	ss(-)RNA 16 kb	ss(-)RNA 15 kb	ss(-)RNA 11k b
Capsid symmetry	Icosahedral	Icosahedral	Complex	Icosahedral	Icosahedral	Icosahedral	Icosahedral	Icosahedral	Helical	Helical
Virion	Enveloped	Naked	Complex coats	Naked	Naked	Naked	Naked	Enveloped	Enveloped	Enveloped
Replication site	Nucleus and cytoplasm	Nucleus and cytoplasm	Cytoplasm	Cytoplasm	Cytoplasm	Cytoplasm	Cytoplasm	Cytoplasm	Cytoplasm	Cytoplasm
Methods of entry	HVEM, nectin-1, nectin 2	CAR, CD46	Receptor-mediated endocytosis	JAM-A	CAR/ICAM1/DAF	Endocytosis	CD155	SLAM, CD46	Sialic acid	LDLR
Blood-brain barrier penetration	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-
Advantages	Large genome to insert large fragments and multiple transgenes; drug to shut-off	Feasibility of manufacturing high viral titers; ease of genome manipulation; inherently potent lytic activity	Fast, efficient spreading virus; high-speed life cycle; up to 40kd large gene fragment insertion; enough knowledge due to smallpox	Good adaptability for intravenous injection; displaying no dose-limiting toxicity	Good adaptability for intravenous injection	Nonpathogenic in human	Clinical trial experience	Clinical trial experience	Nonpathogenic in human	High-speed life cycle; nonpathogenic in human
Disadvantages	Pathogenicity; ubiquitous nAbs	Extensive tissue tropism	Pathogenicity	Rarely gene-editing	Pathogenicity; ubiquitous nAbs	Clinical trials were not entirely satisfactory	Highly pathogenic in neurons of the human	Pathogenicity	Rarely gene-editing	Clinical trials were not entirely satisfactory; rarely gene-editing

Fonte: Lin *et al.* (2023).

Resultados concretos já são observados. Em 2004, foi aprovado na Letônia, Geórgia e Armênia, o ECHO-7 Rigvir[®], desenvolvido com uma cepa modificada do vírus ECHO-7, que pertence à família *Picornaviridae* (Alberts *et al.*, 2016). Já em 2005, o governo da República Popular da China aprovou o vírus H101 (Adeno-5), comercializado como Oncorine[®], no tratamento de carcinoma de células escamosas na região da cabeça e do pescoço (Wei *et al.*,

2018). O adenovírus foi geneticamente modificado sem o gene E1B, com o intuito de inativar o gene p53 das células hospedeiras (Garber, 2006).

Posteriormente, em 2015, a FDA (Food and Drug Administration), a Agência Federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA (Estados Unidos da América), aprovou o primeiro VO americano para uso clínico, o HSV-1 (herpervírus simples tipo 1), comercializado como OncoVexGM-CSF® ou Imlygic™, no tratamento do melanoma cutâneo, subcutâneo, recorrente ou inoperável (Kemp *et al.*, 2020; Raman; Hecht; Chan, 2019). Além dos EUA (NCI, 2015), o medicamento foi aprovado na União Europeia (EMA, 2016) e na Austrália (NPS, 2017).

Teserpaturev/G47Δ (Delytact®) é um vírus oncolítico recombinante de herpesvírus simples tipo 1 de terceira geração, para tratar vários cânceres sólidos. Este vírus, que foi aprovado no Japão em 2021 para tratar gliomas malignos, está sendo investigado em ensaios clínicos para câncer de próstata (fase II), mesotelioma pleural maligno (fase I) e neuroblastoma olfatório recorrente (fase I) (Frampton, 2022; Sugawara *et al.*, 2021).

3.5.1 Viroterapia com VDN

Em meados dos anos 50, foi relatado que o VDN, altamente patogênico para mais de 240 espécies de aves, possuía capacidades oncolíticas (Flanagan; Love; Tesar, 1955; Sinkovics, 1957). Quase uma década depois, foi observado efeito antileucêmico transitório e melhora clínica com baixos eventos adversos (EA), em um paciente com leucemia mieloide aguda, tratado com VDN (Wheelock; Dingle, 1964). Na mesma época, Cassel e Garrett notaram lise de células neoplásicas e imunidade antitumoral, em camundongos com tumor ascítico de Ehrlich, inoculados com VDN (Cassel; Garrett, 1965, 1966).

Já no início dos anos 70, Csatory relatou um caso na Hungria, de um homem que apresentou regressão do câncer de cólon metastático agressivo, após um surto da doença de Newcastle em sua fazenda (Csatory, 1971).

As pesquisas de Cassel chamaram a atenção de vários pesquisadores (Nelson, 1999). Em 1994, foi relatada a regressão completa de neuroblastoma humano transplantado em camundongos atímicos, tratados com uma única injeção da cepa do VDN de Cassel (Lorence *et al.*, 1994) e, a partir deste caso, a viroterapia com VDN foi considerada como medicina alternativa e complementar pelo NCI (*National Cancer Institute*) (Nelson, 1999).

Desde então, numerosos estudos demonstraram o potencial terapêutico de cepas do VDN selvagens ou recombinantes, como monoterapias ou em combinação com outros

tratamentos. Efeitos oncolíticos *in vitro* foram observados em células humanas de astrocitoma (Zulkifli *et al.*, 2009), astrocitoma anaplásico (Ali *et al.*, 2011), carcinoma de células renais (Ch'ng *et al.*, 2015), glioblastoma (Koks *et al.*, 2015), adenocarcinoma colorretal (Assayaghi; Alabsi; Ali, 2016), linfoma de células B (Sánchez *et al.*, 2016), adenocarcinoma pulmonar (Ye *et al.*, 2018) glioma (Bai *et al.*, 2018), carcinoma hepatocelular (Meng *et al.*, 2019), melanoma (Shao *et al.*, 2019) e câncer cervical (Nejad *et al.*, 2020).

Além de testes *in vitro*, foi observada redução significativa da viabilidade de tecido *ex vivo* de glioma humano tratado com a cepa VDN-V4UPM (Mustafa *et al.*, 2013). Já em 2006, foi realizado um estudo clínico de fase I e II com pessoas portadoras de glioblastoma multiforme; um paciente obteve resposta completa após tratamento com injeção intravenosa da cepa VDN-HUJ, que exibiu toxicidade mínima (Freeman *et al.*, 2006).

Efeitos oncolíticos também foram descritos em modelos animais com leucemia mielomonocítica (Alabsi *et al.*, 2012), glioblastoma multiforme (Koks *et al.*, 2015), câncer de próstata (Raghunath *et al.*, 2017), carcinoma hepatocelular (Wu *et al.*, 2017), glioma (Fan *et al.*, 2018) e melanoma (Vijayakumar; Palese; Goff, 2019).

3.5.1.1 Cepas do VDN

É importante salientar que a atividade oncolítica direta do vírus e a resposta imunológica podem variar entre os tumores e entre as cepas do VDN (Tayeb; Zakay-Rones; Panet, 2015).

As cepas do VDN são classificadas conforme a patogenicidade, em lentogênicas, mesogênicas e velogênicas (Liu, 2014). Também podem ser categorizadas em dois grupos quanto sua atuação na neoplasia: cepas oncolíticas (líticas), formadoras de sincícios *in vitro* ou *in vivo* (Song *et al.*, 2019) e cepas não oncolíticas (não-líticas), com potencial de impedir a progressão tumoral e aumentar a sobrevida, apesar de seu efeito ainda não ter sido totalmente elucidado (Song *et al.*, 2019).

As aves são principalmente vacinadas com cepas lentogênicas do VDN, como as cepas Ulster, NDV Hitchner-B1 (HB1) e LaSota e, até o momento, não há registro de mortalidade em aves devido à infecção por VDN lentogênico (Zamarin; Palese, 2012).

Cepas lentogênicas como Ulster, NDV Hitchner-B1 (HB1), LaSota HUJ e V4-UPM, são utilizadas em estudos pré-clínicos e possuem potencial oncolítico em culturas celulares e em modelos animais experimentais (Burman; Pesci; Zamarin, 2020; Pathak; Pal; Malik, 2023). Apesar disso, a replicação do vírus e a destruição da célula tumoral são restritas a tecidos específicos (Dimitrov *et al.*, 2016).

As cepas mesogênicas 73T, AF2240, Beaudette C, Italien, MTH-68/H e PV701, são utilizadas em estudos pré-clínicos (Burman; Pesci; Zamarin, 2020). 73T, MTH-68/H e PV701 possuem potencial oncolítico em culturas celulares e em modelos animais experimentais (Csatary, 1971; Lorence *et al.*, 1994). A cepa mesogênica Anhinga é uma potencial candidata para viroterapia oncolítica, por induzir a formação de potentes células sinciciais *in vitro* (He *et al.*, 2016). 73T não é patogênica para aves ; já MTH-68/H e PV701 são patogênicas para aves (Csatary, 1971; Lorence *et al.*, 1994). Todas as cepas mesogênicas são classificadas como líticas (Ganar *et al.*, 2014) e apresentam superioridade na replicação viral, destruição da célula tumoral e formação de células sinciciais (Burman; Pesci; Zamarin, 2020; Dimitrov *et al.*, 2016).

3.5.1.2 Vantagens do VDN

A utilização do VDN tem demonstrado ser mais vantajosa em comparação a outros VOs (Schirmacher; Fournier, 2009). Primeiramente, seu uso na avicultura como vacina há mais de 60 anos, evidencia a superestabilidade do genoma (Schirmacher, 2017). Ademais, o fato de aproximadamente 96 % da humanidade ser soronegativa para o VDN, impede que pacientes sejam pré imunes para a doença de Newcastle, o que é potencialmente um problema com o adenovírus, o hespesvírus e vírus vaccinia (Schirmacher; Van Gool; Stuecker, 2019); ou seja, a utilização de vírus aviários no tratamento do câncer em mamíferos é especialmente vantajosa devido a probabilidade da inexistência de anticorpos neutralizantes (Yang *et al.*, 2024). Esta ausência em mamíferos pode aumentar a susceptibilidade desses hospedeiros à infecção pelo VDN (Sánchez *et al.*, 2016).

Outra vantagem é a particularidade que o vírus possui de realizar sua replicação no citoplasma e não incorporar seu genoma ao da célula hospedeira (Kan *et al.*, 2021; Niu *et al.*, 2015).

O VDN atende às três condições ideais da terapia anticâncer. A citotoxicidade seletiva permite que este vírus mate apenas células cancerosas, conservando as células normais do paciente (Fountzilas; Patel; Mahalingam, 2017; Yurchenko *et al.*, 2018). Além disso, as cepas líticas são eficientes na destruição direta das células tumorais (Kalyanasundram *et al.*, 2018; Nelson, 1999). Outrossim, as cepas não líticas depositam proteínas virais na membrana da célula neoplásica, desencadeando forte resposta imune antitumoral (Kalyanasundram *et al.*, 2018; Nelson, 1999).

Para além disso, o VDN apresenta custos de produção reduzidos, possibilita administração por múltiplas vias e é associado a mínimos EA (Cuadrado-Castano *et al.*, 2015b).

3.5.1.3 Potencial zoonótico do VDN

O VDN já foi isolado em várias espécies não avícolas, incluindo: macacos, coelhos, visoms, hamsters, porcos e humanos. Essas infecções em mamíferos destacam a capacidade do VDN em cruzar barreiras entre espécies, levantando preocupações sobre seu potencial zoonótico e a necessidade de vigilância em populações em risco, como trabalhadores da avicultura e indivíduos imunocomprometidos (Ul-Rahman *et al.*, 2022).

A primeira infecção humana documentada ocorreu em 1942 e, desde então, houve relatos de infecções em humanos associadas a exposições ocupacionais, especialmente em contextos veterinários ou laboratoriais (Ul-Rahman *et al.*, 2022).

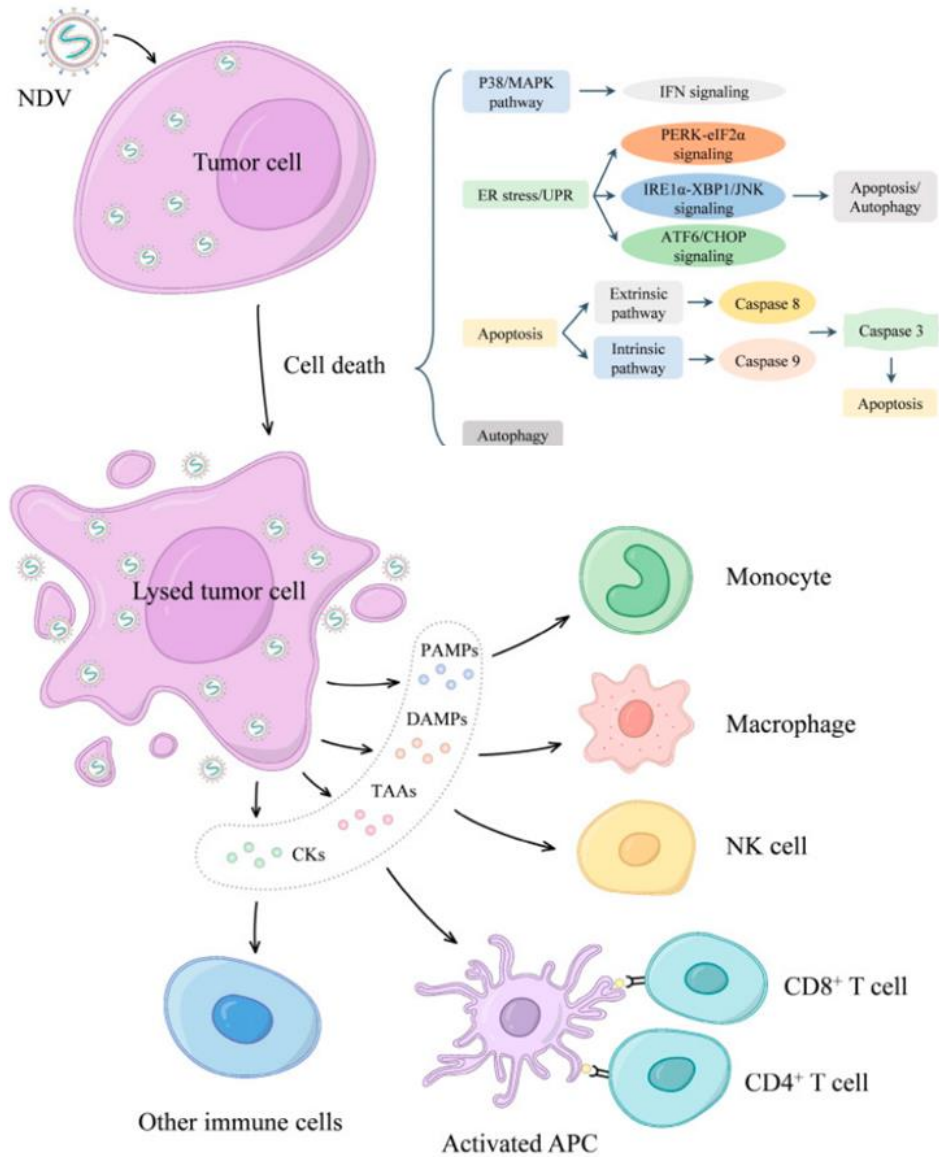
A falta de dados extensivos sobre a exposição e infecção em espécies não avícolas, especialmente mamíferos, também contribui para a incerteza sobre o real risco zoonótico do VDN (Ul-Rahman *et al.*, 2022).

3.6 Mecanismos do VDN para indução de destruição da célula tumoral e resposta imune antitumoral

Estudos pré-clínicos relataram os principais mecanismos de atuação do VDN em células cancerosas (Imagem 7).

O VDN mata seletivamente as células tumorais e, simultaneamente, estimula uma resposta imune antitumoral (SONG *et al.*, 2019) tanto inata quanto adaptativa, potencializando seus efeitos oncolíticos (Burke *et al.*, 2020; Zhan *et al.*, 2020), sendo a imunidade antitumoral adaptativa forte e duradoura (Osali *et al.*, 2020).

Imagem 7 - Morte de células tumorais por diferentes vias e resposta imunológica inata e adaptativa induzida pelo vírus da doença de Newcastle.



Fonte: Yang *et al.* (2024).

3.6.1 Resposta imune inata

3.6.1.1 Indução de MCI

A MCI ocorre após o término da síntese de proteínas virais e exposição aos antígenos virais HN e F na superfície (SONG *et al.*, 2019). O VDN é capaz de induzir a MCI através da via P38/MAPK (p38 quinase ativada por mitógeno) (Yang *et al.*, 2024) estresse do retículo endoplasmático (ER) (Yang *et al.*, 2024), apoptose (Keshavarz *et al.*, 2020; Nejad *et al.*, 2020),

autofagia (Jin *et al.*, 2021; Shao *et al.*, 2019), necrose (Song *et al.*, 2019) e piroptose (Song *et al.*, 2019). Recentemente, foi relatado que o VDN causou morte de células tumorais por ferroptose (Kan *et al.*, 2021).

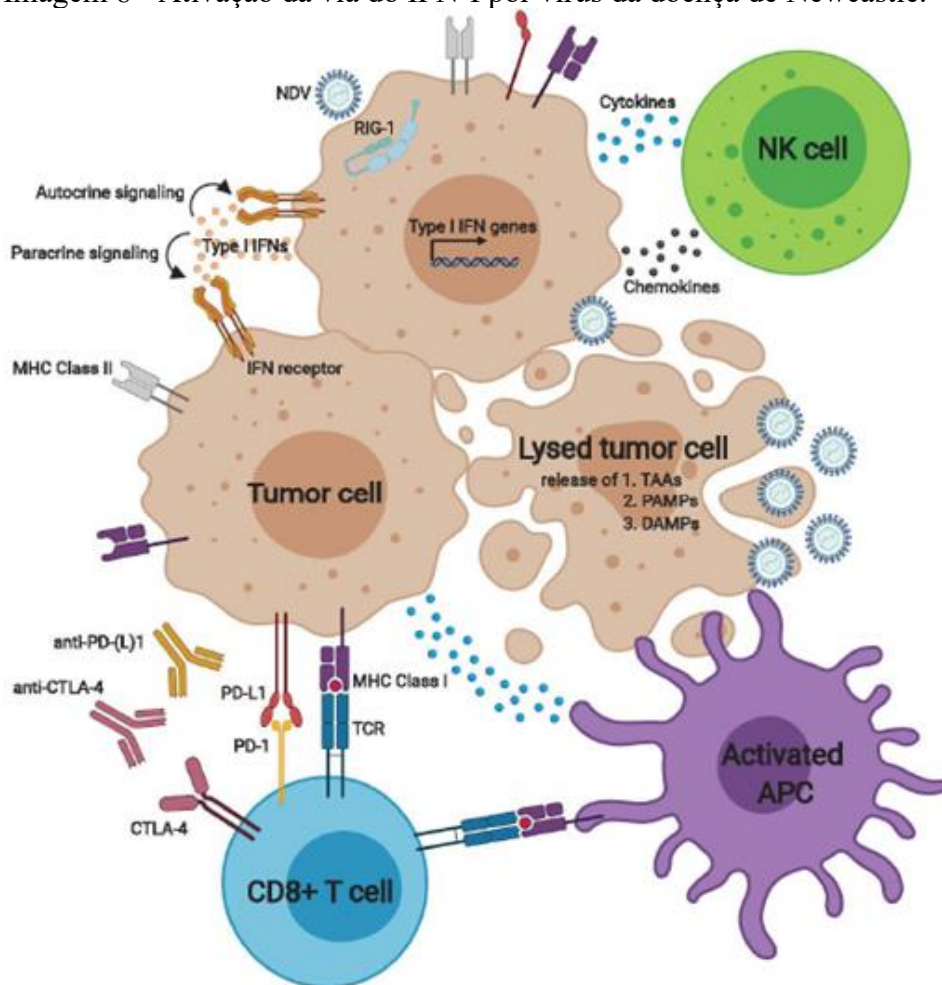
Após a destruição da célula tumoral, há liberação da progênie viral, que infecta células neoplásicas vizinhas (Ji *et al.*, 2017; Welch *et al.*, 2014).

3.6.1.1.1 Morte celular pela via p38 quinase ativada por mitógeno (P38/MAPK)

Embora as células tumorais frequentemente apresentem uma sinalização comprometida para o IFN-I (Burman; Pesci; Zamarin, 2020), esses interferons ainda podem causar algum dano ou efeito negativo nas células tumorais. A infecção pelo VDN pode desencadear MCI por meio da via P38/MAPK (Imagem 8).

Ademais, dado que o VDN pode infectar células normais presentes no TME, é possível que uma resposta do IFN-I seja gerada mesmo após a infecção inicial (Yang *et al.*, 2024).

Imagem 8 - Ativação da via do IFN-I por vírus da doença de Newcastle.



Fonte: Burman; Pesci; Zamarin (2020).

O genoma viral é reconhecido pelo receptor RIG-1 (gene indutor de ácido retinóico 1) no citosol; este leva à secreção de IFN-I e sinalização autócrina e parácrina (Burman; Pesci; Zamarin, 2020).

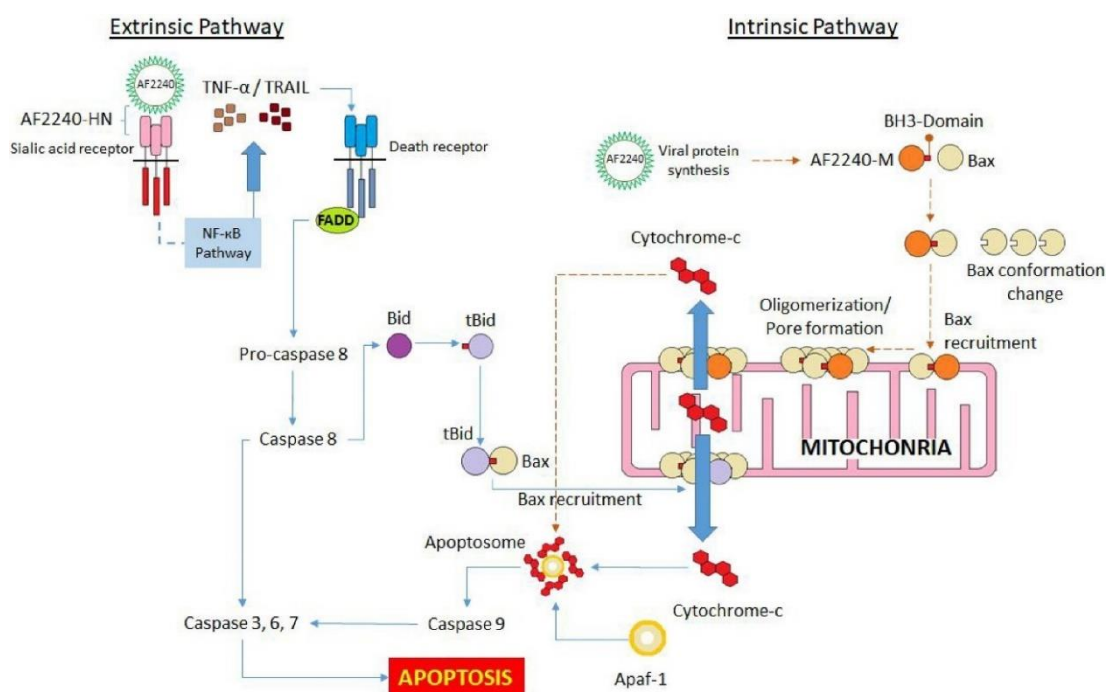
Após sinalização parácrina, o IFN-I desencadeia a exposição dos antígenos virais HN e F na superfície das células cancerosas; estas por sua vez, liberam IFN- α (interferon alfa-2a), TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF), para ativação da cascata apoptótica e reconhecimento de células dendríticas (CDs) (Kalyanasundram *et al.*, 2018; Zeng; Fournier; Schirmacher, 2002).

3.6.1.1.2 Apoptose

O VDN é um dos VOs amplamente pesquisados no contexto da apoptose (Lin *et al.*, 2023).

Os processos de replicação viral e a síntese de novas proteínas virais, induzem a apoptose por ativação das vias intrínseca e extrínseca, dependentes de caspases (Cuadrado-Castano *et al.*, 2015b; Kalyanasundram *et al.*, 2018) (Imagem 9).

Imagem 9 - Via extrínseca e intrínseca de ativação de apoptose pela cepa VDN-AF2240.



Fonte: Kalyanasundram *et al.* (2018).

A ligação da proteína HN com o receptor de ácido siálico da superfície da célula tumoral, desencadeia a via extrínseca / do receptor de morte, por liberação de TNF-α e TRAIL (Kalyanasundram *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2019). Estas citocinas reconhecem e se ligam aos seus respectivos receptores de morte na superfície da célula que, por sua vez, convertem a pró-caspase 8 em caspase 8, através da proteína FADD (Kalyanasundram *et al.*, 2018). Consequentemente, a caspase 8 ativa diretamente a via de execução de apoptose, ou seja, ativa as caspases 3, 6 e 7, que realizam a clivagem das proteínas intracelulares (Kalyanasundram *et al.*, 2018).

A via intrínseca / mitocondrial, independente de IFN-I, também pode induzir a apoptose por recrutamento da via extrínseca, no intuito de amplificar a cascata apoptótica (Elankumaran; Rockemann; Samal, 2006; Kalyanasundram *et al.*, 2018). Após a ativação da

caspase 8, esta realiza a clivagem da proteína pró-apoptótica Bid pra tBid, ativando-a. O domínio BH3 da tBid interage com a proteína pró-apoptótica Bax, que se desloca para a membrana mitocondrial e ativa a permeabilização da MOMP (membrana externa mitocondrial) e há liberação de citocromo-c (Elankumaran; Rockemann; Samal, 2006; Kalyanasundram *et al.*, 2018).

A via intrínseca também pode ser desencadeada após a síntese de proteína viral, pela interação do domínio BH3 da proteína Bax com a proteína M do VDN, no citosol (Kalyanasundram *et al.*, 2018). A mudança conformacional na Bax, leva ao seu deslocamento até a mitocôndria. O acúmulo de Bax na superfície mitocondrial leva à oligomerização, MOMP e posterior liberação de citocromo-c (Kalyanasundram *et al.*, 2018).

O citocromo-c interage com a Apaf-1 (protease associada à apoptose 1), formando o apoptossoma. Este, ativa a caspase-9 que, por sua vez, ativa as caspases executoras, completando a apoptose (Kalyanasundram *et al.*, 2018).

3.6.1.2 Liberação de antígenos

A destruição da célula tumoral resulta na liberação de PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos), DAMPs (padrões moleculares associados a danos), bem como TAAs (antígenos associados a tumores) e citocinas pelas células destruídas (Hu *et al.*, 2017; Serrano-Del Valle *et al.*, 2019).

A maturação e a ativação de CDs com capacidade de apresentação cruzada de antígenos, ocorre em resposta ao reconhecimento desses fatores locais (Burman; Pesci; Zamarin, 2020; Fuertes *et al.*, 2011).

3.6.1.3 Células NK e macrófagos na resposta imune antitumoral

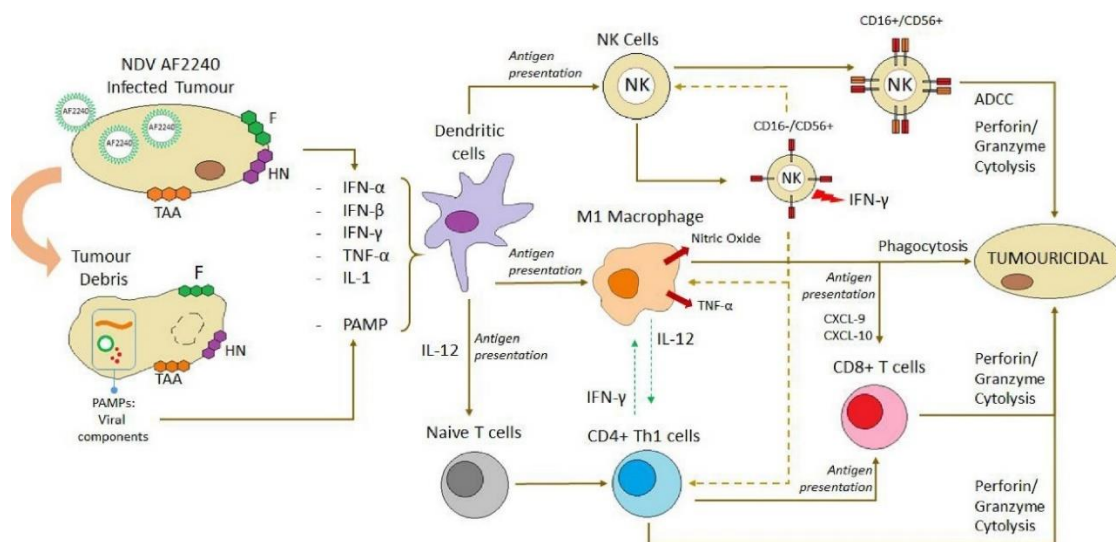
A infecção pelo VDN ativa diretamente células NK (Jarahian *et al.*, 2009), monócitos (Washburn *et al.*, 2003), macrófagos (Schirmacher *et al.*, 2000) e CDs (Zhao *et al.*, 2008). Estas células imunológicas, com propriedades citolíticas e fagocíticas, direcionam-se às células tumorais infectadas que demonstram resistência à lise viral.

DAMPs e PAMPs são reconhecidos por células NK e CDs, através de TLR 3, 7, 8 e 9 (receptores extracelulares toll-like 3, 7, 8 e 9) e receptores intracelulares como RIG-1, desencadeando resposta do IFN-I (Kalyanasundram *et al.*, 2018; Takeuchi; Akira, 2010).

Os TAAs, por sua vez, são expressos na superfície das células tumorais, juntamente com HN e F, para serem reconhecidos por CDs (Kalyanasundram *et al.*, 2018).

Após apresentação de antígenos, as células NK sofrem diferenciação e há ativação de macrófagos M1 (Imagem 10).

Imagem 10 - A apresentação de antígenos resulta na transformação das células NK e na ativação dos macrófagos M1 após administração da cepa AF2240 do vírus da doença de Newcastle.



Fonte: Kalyanasundram *et al.* (2018).

Por apresentação de antígenos aos receptores CD16⁺ / CD56⁺, as células NK se diferenciam em NK citotóxicas e por ligação aos receptores CD16⁻ / CD56⁺, se diferenciam em NK secretoras de IFN-γ (interferon gama). As NK citotóxicas realizam atividade tumoricida por liberação de perforina e granzima em células neoplásicas e indução de ADCC (citotoxicidade celular dependente de anticorpos) (Kalyanasundram *et al.*, 2018; SONG *et al.*, 2019). Já as células NK secretoras de IFN-γ induzem a proliferação de células NK complementares, macrófagos com fenótipo M1 e células CD4⁺ Th1 (Kalyanasundram *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2019). Ademais, a ligação de HN ao receptor NKp46 (proteína p46 relacionada à célula natural killer) de células NK do sangue periférico, aumentam a secreção de IFN-α e TRAIL (Song *et al.*, 2019).

Por apresentação de antígenos aos macrófagos, eles são convertidos ao fenótipo ativado M1, secretam NO e TNF-α e realizam fagocitose das células cancerosas (Schirmacher *et al.*, 2000; Zamarin *et al.*, 2014). A ativação dos macrófagos M1 é essencial para impedir a ação de TAMs (como macrófagos M2). Os macrófagos M2 modificam a resposta inflamatória, auxiliando no crescimento tumoral (Williams; Yeh; Soloff, 2016).

3.6.2 Resposta imune adaptativa

3.6.2.1 Ativação de células T

As CDs processam os antígenos virais e tumorais e os apresentam na superfície, através de MHC I e MHC II, que ativam os linfócitos CD8⁺ e CD4⁺, respectivamente, através do TCR (receptor de células T), desencadeando resposta antiviral do IFN-I (MARTINI *et al.*, 2020; SONG *et al.*, 2019). Os macrófagos também são ativados por apresentação de TAAs pelas CDs (Zamarin; Wolchok, 2014).

Devido a apresentação de antígenos pelas CDs, bem como por liberação de IL-12 (interleucina-12), há sinalização para diferenciação de CD4⁺ *naive* em células CD4⁺ Th1. A secreção de IFN- γ por CD4⁺ Th1, polariza os macrófagos M1. Estes, por sua vez, liberam IL-12 e induzem a proliferação de CD4⁺ Th1 adicionais (Kalyanasundram *et al.*, 2018).

Células CD4⁺ Th1 ativam linfócitos CD8⁺ infiltrantes de tumor, através da apresentação de antígenos; já os macrófagos M1 ativam células CD8⁺ por apresentação de antígenos e liberação de CXCL9 e CXCL10 (ligantes de quimiocinas CXC 9 e 10) (Kalyanasundram *et al.*, 2018). Linfócitos CD4⁺ Th1 e CD8⁺ combatem células tumorais por citólise mediada por perforinas e granzimas (Tayeb, Zakay-Rones, Panet, 2015; Kalyanasundram *et al.*, 2018).

Os efeitos oncolíticos do VDN não são tão cruciais quanto os efeitos imunológicos, visto que estes são de longa duração (células imunes de memória) e não cessam quando o vírus é totalmente destruído (Kemp *et al.*, 2020). Destarte, uma das metas essenciais na viroterapia oncolítica é a infiltração tumoral por linfócitos T (Graaf *et al.*, 2020).

3.7 O uso do VDN no câncer de mama humano e murino

De acordo com as estimativas da IARC (Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer), o câncer de mama feminino foi o segundo mais diagnosticado no mundo em 2022 (11,6 % dos casos), bem como foi apontado como a primeira causa de morte por câncer em mulheres, no mesmo ano (Bray Bsc *et al.*, 2024).

Várias terapias convencionais têm sido ineficazes contra o câncer mamário. A resistência aos tratamentos existentes e seus respectivos EA extenuantes, levaram as pesquisas a uma nova era de tratamento para o câncer utilizando vírus (Javanbakht *et al.*, 2021).

A viroterapia com VDN tem sido estudada como uma alternativa promissora (Ahmad *et al.*, 2015), utilizando linhas celulares, modelos animais e ensaios clínicos para o estudo e tratamento do câncer de mama humano (Coletto; Fonseca; Medeiros-Ronchi, 2024).

3.7.1 Pesquisas *in vitro*

Diversas linhagens de células derivadas de pacientes com câncer de mama feminino foram tratadas com cepas do VDN.

Diversos estudos investigaram a capacidade apoptótica do VDN em linhagens celulares humanas e murinas. Meyyappan (2003) utilizou as cepas AF2240 e V4-UPM nas linhagens MCF7 (células humanas de carcinoma mamário invasivo, de nenhum tipo especial, positivas para receptores de estrogênio e progesterona [ER⁺ PR⁺]) e MDA-MB-231 (células humanas de carcinoma ductal invasivo, triplo negativo [HER2⁻ ER⁻ PR⁻]). Ambas linhagens apresentaram características de apoptose: retração celular, vacuolização citoplasmática, fragmentação nuclear, condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos. Entretanto, a atividade apoptótica da cepa AF2240 foi significativamente mais eficaz. A linha celular MDA-MB-231 foi significativamente mais reativa à ambas as cepas.

Já em 2006, Elankumaran; Rockemann; Samal (2006) modificaram e recombinaram as cepas Beaudette C e La Sota, nas cepas rLa Sota, rLa SotaV.F., rBC, rBC-EGFP e rBC-Edit. Todas foram citotóxicas para a linhagem MCF7, exceto rLa SotaV.F. Os autores observaram que a destruição da célula tumoral foi dependente da via de apoptose intrínseca, com ativação precoce de caspase-9 e caspase-3. A clivagem da caspase 8 foi um evento tardio induzido por TRAIL. Houve baixa replicação e ausência de atividade oncolítica das cepas VDNr em células MCF7 nulas de caspase-3, demonstrando que a apoptose por VDN é dependente de caspase. Ademais, Hassan; Allawe; Al-Shammari (2020) e Hassan; Al-Shammari; Allawe (2020), igualmente observaram apoptose ativada pela via intrínseca, por aumento expressivo da caspase-9, em células AMJ13 (células humanas de carcinoma mamário invasivo, de nenhum tipo especial, negativas para receptores de estrogênio e progesterona [ER⁻ PR⁻]), AMN3 (células murinas de adenocarcinoma mamário) e MCF7, tratadas com a cepa La Sota.

Além dessas, outras pesquisas foram conduzidas para investigar a capacidade apoptótica do VDN. Kalid *et al.* (2010) detectaram regulação positiva dos genes pró-apoptóticos MYBL2 (oncogene viral homólogo de mieloblastose v-myb [aviária] tipo 2) e PUMA (modulador de apoptose regulado positivamente por p53), por análise transcriptômica de células MCF7 infectadas com AF2240. Já em 2013, foi relatado que a expressão do gene HN da cepa AF2240 foi suficientemente capaz de induzir a apoptose em células MCF7 e que a atividade apoptótica do gene NP foi independente da replicação viral e da síntese de proteínas virais, possivelmente iniciada na fase inicial do ciclo de vida do vírus e ativada pela via intrínseca (Ghrichi *et al.*, 2013b, 2013a). Ademais, Othman *et al.* (2010) observaram aumento significativo de células apoptóticas na linhagem celular MCF7 infectada com a cepa AF2240,

três dias após a infecção. Adicionalmente, Ahmad *et al.* (2015) utilizaram a mesma cepa em células MDA-MB-231 e observaram aumento dos indutores de apoptose.

Já em 2021, Shan *et al.* (2021) relataram que a cepa NDV-D90 foi altamente eficaz na eliminação das células BT549 (células humanas de carcinoma mamário ductal, triplo negativo [HER2⁻ ER⁻ PR⁻]) e MCF7, de maneira dependente do tempo e da dose. O estudo revelou que a indução de apoptose nas células BT549 ocorreu através das vias de sinalização intrínseca e extrínseca, enquanto nas células MCF7, foi observada apenas a via intrínseca.

A secreção de citocinas inflamatórias por células tumorais humanas, quando inoculadas pelo VDN, foram alvo de pesquisas. Zhao *et al.* (2008) observaram altos níveis de expressão de IL-2 (interleucina 2) em linhas de células tumorais humanas, incluindo MCF7, com o uso de uma cepa recombinante derivada da La Sota contendo o gene da IL-2 (rVDN/IL2). Já Burke *et al.* (2020) relataram forte resposta imunológica em células MDA-MB-231, com o uso da cepa recombinante MEDI5395, derivada da cepa 73T. Foi observado regulação positiva dos receptores PD-L1, CD80 (cluster de diferenciação 80) e do HLA-DR (receptor de superfície celular de MHC II), além da produção de IFN- α 2a (Interferon alfa-2a), IL-6 (interleucina 6), IL-8 (interleucina 8) e TNF- α . Ahmed *et al.* (2014), por sua vez, relataram que após o tratamento com a cepa AF2240 em células MDA-MB-231, a produção de NO e TNF- α *in vitro* foi relevante para a atividade citotóxica de macrófagos RAW 264.7. Já Amin *et al.* (2019), observaram efeitos citotóxicos em células MCF7 e MDA-MB-231, com o uso de uma cepa recombinante derivada da AF2240 contendo o gene da IL-12 (rAF-IL12).

A secreção de citocinas inflamatórias por células tumorais murinas, também foram alvo de pesquisas. Amin *et al.* (2019), observaram efeitos citotóxicos em células 4T1 (células murinas de adenocarcinoma mamário), com o uso de uma cepa recombinante derivada da AF2240 contendo o gene da IL-12 (rAF-IL12).

As células cancerosas captam mais glicose que as células normais, para seu metabolismo dependente de glicólise, ou seja, o efeito Warburg (Warburg, 1931, 1956). Esse metabolismo pode ser redirecionado através da quimioterapia com as moléculas competidoras de glicose 2-DG (2-desoxiglicose) (Aft; Zhang; Gius, 2002). Al-Shammari *et al.* (2019) observaram efeito antitumoral da cepa AMHA1 combinada com 2-DG, em células AMJ13 e AMN3, com inibição significativa da progressão tumoral *in vitro*. Já Al-Ziaydi *et al.* (2020) avaliaram os efeitos da cepa AMHA1 no metabolismo energético das células AMJ13 e MCF7. Os pesquisadores observaram eficácia na replicação viral, indução de apoptose e considerável diminuição da atividade glicolítica, por decréscimo de piruvato e ATP (adenina trifosfato).

Os cânceres dispõem fortemente da angiogênese para intensificar a vascularização tumoral, essencial para a progressão e disseminação da neoplasia. Terapias que redirecionam a angiogênese são importantes para a eficácia dos tratamentos. Al-Shammari *et al.* (2020) relataram regulação negativa de angiopoietina-1, angiopoietina-2 e do EGF (fator de crescimento epidérmico) na linhagem AMN3.

Células tumorais hipóxicas superexpressam genes pró-sobrevivência, como o HIF (fator indutível por hipóxia), impactando negativamente a terapêutica. Abd-Aziz; Stanbridge; Shafee (2016) observaram que a degradação de HIF-1 α (fator indutível por hipóxia 1-alfa), independente de p53, em células MCF7 infectadas com a cepa AF2240, demonstrou o potencial terapêutico desta cepa na eliminação de células neoplásicas hipóxicas.

3.7.2 Pesquisas utilizando modelos murinos *in vivo*

Swaminathan (2010) testou os efeitos antitumorais de diferentes titulações HAU (unidades de hemaglutinação) da cepa AF2240 e / ou CT (citrato de tamoxifeno), no tratamento de células 4T1 *in vivo*. Foi observado progressão tumoral no grupo tratado somente com CT, VDNHAU32 + CT e VDNHAU64 + CT e não foi observado crescimento da neoplasia nos grupos tratados somente com VDN (VDN16HAU, VDN32HAU, VDN64HAU), VDNHAU8 + CT e VDNHAU16 + CT.

A secreção de citocinas inflamatórias foi alvo de pesquisas. Raihan *et al.* (2019) observaram a produção de IFN- γ , IL-6, IL12, CCL2 e TNF- α e considerável inibição de crescimento neoplásico em células 4T1 de camundongos alotransplantados, infectados com a cepa AF2240.

Com relação à avaliação da eficácia do tratamento intratumoral com o VDN em modelos animais experimentais, Al-shammari *et al.* (2019) realizaram injeções intratumorais em camundongos com neoplasias estabelecidas de adenocarcinoma mamário murino (células AN3) e observaram diminuição significativa ($p < 0,0001$) no volume do tumor em comparação com o grupo controle não tratado. Além disso, relataram indução de alta taxa de inibição do crescimento tumoral (96,8 %) ao final do experimento.

Alguns pesquisadores avaliaram a angiogênese e a regressão tumoral. Al-Shammari *et al.* (2020) observaram regressão expressiva do tumor e da angiogênese, em seções de carcinoma mamário AMN3, em camundongos imunocompetentes singênicos, tratados com a cepa AMHA1. Já em 2021, pesquisadores chineses aplicaram quatro injeções intratumorais da cepa NDV-D90 em camundongos de seis semanas de idade que haviam sido xenotransplantados com

células MCF7. Notavelmente, apenas oito dias após o início da terapia, foi observado efeito inibitório significativo que levou a uma supressão substancial do tumor (Shan *et al.*, 2021).

3.7.3 Ensaios clínicos e relato de caso

Dois ensaios clínicos de fase I investigaram a cepa PV701 do VDN em pacientes humanos com tumores sólidos avançados. Pecora *et al.* (2002), administraram injeções intravenosas únicas ou repetidas em 79 pacientes, oito dos quais tinham câncer de mama. Todos os pacientes que possuíam evidência clara de progressão da doença antes do início da viroterapia, não apresentaram progressão tumoral por 4 a 30 meses. Em um paciente com carcinoma mamário, houve uma redução mensurável do tumor, mas inferior a 50 %, na carga tumoral total. Já Laurie *et al.* (2006) realizaram um protocolo em duas etapas em 16 pacientes, dois dos quais tinham câncer de mama. Entre os pacientes com carcinoma mamário, um apresentou estabilização prolongada da doença, sem progressão por pelo menos 6 meses como um resultado positivo do tratamento.

Além disso, em 2015, foi relatado um caso notável envolvendo uma paciente com câncer de mama com metástases hepáticas. A abordagem de tratamento para esta paciente consistiu em 13 sessões de imunoterapia sistêmica com VDN, hipertermia por radiofrequência aplicada ao fígado e cinco vacinações utilizando CDs derivadas de células de câncer de mama infectadas com VDN (destruídas). O tratamento foi bem tolerado pela paciente. Até o momento, há registro de notável sobrevida a longo prazo de 66 meses desde o diagnóstico inicial, além do fato de que ela manteve uma alta qualidade de vida e não houve sinais de recorrência do tumor. Esse promissor desfecho clínico foi atribuído à viroterapia com VDN, já que a paciente não havia passado por nenhum tratamento convencional e não fez mudanças significativas no estilo de vida (Schirmacher *et al.*, 2015).

Os diversos efeitos oncolíticos do VDN observados em modelos *in vitro* e *in vivo*, humanos e murinos, o classificam como candidato à terapia contra o câncer de mama feminino (Martini *et al.*, 2020).

Apesar disso, ainda existem desafios e questões a serem respondidas, incluindo utilização de protocolos de administração mais adequados e avaliação dos resultados a longo prazo. Novas pesquisas e ensaios clínicos são necessários para aperfeiçoar as estratégias de tratamento e avaliar plenamente os benefícios terapêuticos do VDN (Coletto; Fonseca; Medeiros-Ronchi, 2024).

3.8 Segurança e eventos adversos (EA) da viroterapia com VDN em humanos

3.8.1 Tolerabilidade do paciente à viroterapia com o VDN

Existe uma extensa base de dados de segurança para o uso do VDN como terapia oncolítica, principalmente de ensaios clínicos de escalonamento de dose.

Todas as cepas vacinais derivadas do VDN são bem toleradas em estudos clínicos em humanos (Lam *et al.*, 2011). A tolerância dos pacientes à viroterapia inclui a aclimação lenta do sistema imunológico ao baixo nível de antígeno (dessensibilização), com o intuito de evitar uma resposta imune potencialmente esmagadora, especialmente em relação a EA relacionados às citocinas, no período em que o vírus é finalmente administrado (Hotte *et al.*, 2007).

Conforme descreveu Pecora *et al.* (2002), a cepa PV701 do VDN é bem tolerada em doses de pelo menos 3×10^9 unidades infecciosas por via intravenosa e pelo menos 4×10^{12} unidades infecciosas por via intratumoral. Uma dose máxima tolerada após uma dose inicial dessensibilizada reduzida em 12×10^9 UFP/m² (unidades formadoras de placa por metro quadrado) com infusões subsequentes foi aumentada em 10 vezes e tolerada até 120×10^9 UFP/m² (Pecora *et al.*, 2002; Hotte *et al.*, 2007).

Já Laurie *et al.* (2006) realizaram um ensaio clínico de fase I de administração intravenosa de uma cepa do VDN utilizando um protocolo de dessensibilização em duas etapas. Os pesquisadores administraram a primeira (1×10^9 UFP/m²) e a segunda dose (12×10^9 UFP/m²), seguidas por doses escalonadas de 24×10^9 a 120×10^9 UFP/m² para a terceira à sexta dose. A tolerabilidade foi melhorada em comparação com a dosagem em *bolus* rápida usada anteriormente, com a eliminação de sintomas semelhantes aos da gripe grave. Além disso, as reações à infusão diminuíram acentuadamente neste estudo em comparação com os estudos anteriores utilizando cepas do VDN.

Além desses estudos, em 2007, pacientes portadores de tumores sólidos incuráveis, realizaram terapia oncolítica com a cepa PV701 do VDN. Devido infusão lenta, a tolerabilidade do paciente foi melhorada, enquanto a primeira dose foi aumentada com segurança em relação a dois estudos anteriores com a mesma cepa (Hotte *et al.* 2007).

Portanto, o VDN pode ser administrado em altas doses e, quando o tempo de infusão é estendido de 1 para 3 horas, a toxicidade diminui progressivamente (Aghi; Martuza, 2005).

3.8.2 Efeitos adversos à viroterapia com o VDN

De acordo com estudos clínicos em pacientes humanos vacinados com o VDN, os EA gerais apresentados por eles foram:

1. *No local onde foi realizada a vacinação*: eritema, inchaço, endurecimento e coceira (Ockert *et al.*, 1996; Schulze *et al.*, 2009). Já Pecora *et al.* (2002) observaram inflamação/edema tumoral ao exame físico em um paciente com metástase no couro cabeludo e fistula enterocutânea no local do tumor em um paciente com carcinoma de cólon.

2. *Sintomas semelhantes à gripe, relacionados às citocinas*: febre, calafrios, dor de cabeça, náuseas/vômito e diarreia. Pecora *et al.* (2002) relataram 1/3 dos pacientes com fadiga reversível grau 3, quase exclusivamente após a primeira dose e pacientes acima de 70 anos ou anêmicos (hemoglobina 11 g/dL) foram mais propensos a apresentar sintomas similares aos da gripe de maior gravidade. Já Laurie *et al.*, (2006) relataram sintomas leves semelhantes aos da gripe e que foram comumente observados após a primeira dose, mas desapareceram com a administração repetida.

Níveis elevados das citocinas IFN-I, IFN- γ , TNF- α e IL-6 foram observados em pacientes humanos com cânceres sólidos avançados tratados no estudo de Pecora *et al.* (2002), após a primeira dose da cepa PV701 do VDN, com níveis detectados pela primeira vez em 6 horas e com pico na hora 20. Esse padrão foi paralelo ao curso de tempo dos sintomas semelhantes aos da gripe (por exemplo, febre foi consistentemente notada entre as horas 4 e 20). Entretanto, a administração profilática de antipiréticos e antidiarreicos reduziram a incidência e a gravidade dessas toxicidades, por exemplo, com todos os pacientes recebendo antipiréticos profiláticos, a incidência de febre grau 1/2 reduziu de 83 % com a primeira dose para 17 % com a terceira dose, bem como a incidência de febre grau 3 para pacientes neste regime foi reduzida de 13 % na dose 1 para não detectada com doses subsequentes.

3. *Sintomas gerais*: conjuntivite, laringite, dor muscular, fraqueza, letargia, convulsão associada à pacientes que tratavam tumores cerebrais e síncope (Matsuda; Karube; Aruga, 2018; Ockert *et al.*, 1996; Schirmacher, 2004; Schulze *et al.*, 2009). Já Pecora *et al.* (2002) relataram dessaturação de oxigênio observada apenas em pacientes com envolvimento de tumor pulmonar/pleural, dispneia de grau 3 em uma paciente com câncer de mama e derrames pleurais, transaminases hepáticas transitoriamente elevadas em pacientes com metástases hepáticas e hipotensão dose-dependente.

4. *Alterações no sistema hematopoiético*: leucopenia, neutropenia, trombocitopenia transitória, trombose e hemorragia (Pecora *et al.*, 2002; Matsuda; Karube; Aruga, 2018).

Pecora *et al.* (2002) observaram quedas transitórias na contagem de plaquetas e leucócitos nos pacientes tratados com imunoterapia com o VDN. As citocinas IFN e TNF- α são conhecidas por causarem alterações transitórias na contagem de células sanguíneas como resultado de marginalização (Feldman *et al.*, 1992) . No presente estudo, essas alterações

hematológicas transitórias foram induzidas pela primeira dose. Os níveis de leucócitos e plaquetas se recuperaram durante o primeiro ciclo de dosagem repetida, mesmo quando as doses foram 10 vezes maiores do que a primeira dose. As leucopenias e trombocitopenias não foram correlacionadas com sinais de infecção ou sangramento. A falta de efeitos cumulativos parece ser consistente com a marginalização de leucócitos e plaquetas em vez de um processo de consumo.

Até o presente momento, infelizmente foi relatada na literatura médica humana uma possível morte relacionada ao tratamento com o VDN, envolvendo um paciente idoso com carcinoma renal com metástases para os pulmões e função pulmonar comprometida. A autópsia revelou a ocorrência de inflamação no pulmão com tumor, sugerindo uma rápida lise tumoral, levando à insuficiência respiratória fatal após a vacinação (Pecora *et al.*, 2002).

Apesar disso, a segurança das cepas derivadas do VDN tem sido consistentemente alta como agentes anticâncer, exibindo baixa toxicidade. Apesar da observação de EA, as respostas não foram graduadas como graves e não afetaram negativamente a qualidade de vida dos pacientes (Nelson, 1999; Lam *et al.*, 2011).

3.9 Tumores mamário caninos (TMCs)

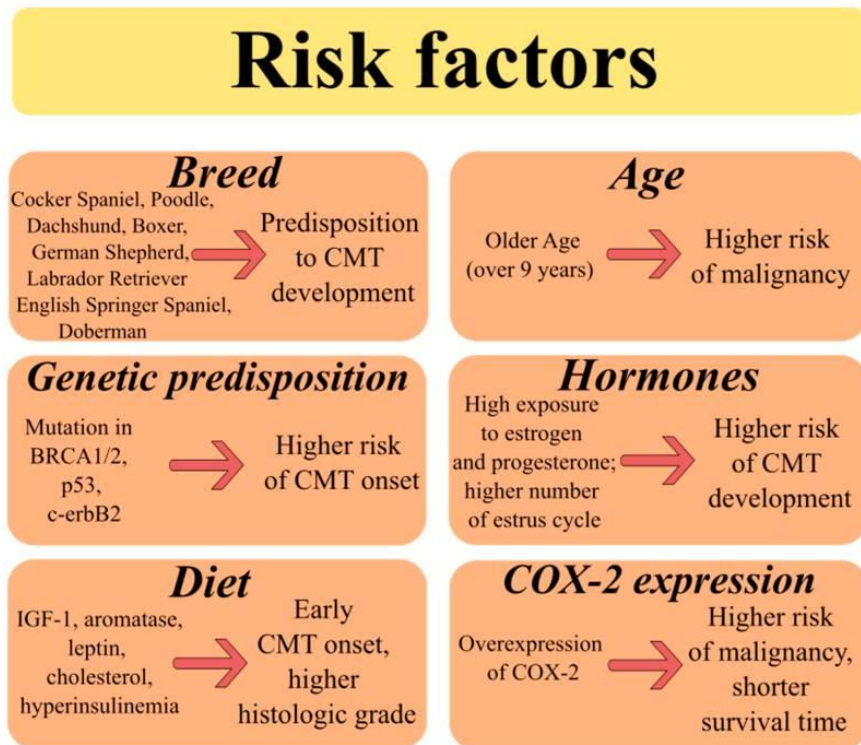
3.9.1 Epidemiologia

Hodiernamente, as neoplasias são uma das principais causas de morte em pequenos animais, devido a maior longevidade destas espécies, diagnósticos tardios e a restrição de tratamentos eficazes (Das *et al.*, 2017; Fleming; Creevy; Promislow, 2011). Outrossim, metade dos cães acima de 10 anos de idade portadores de cânceres, morrem devido a progressão do tumor (Hansen; Khanna, 2004; Patil *et al.*, 2012).

Em cadelas, os tumores mamários são os mais comumente identificados (Goldschmidt; Peña; Zappulli, 2017; Misdorp; Else; Hellmén, 1999), apresentando frequência acima de 50 % (Allen; Prasse; Mahaffey, 1986). Observa-se ainda que, nas fêmeas, aproximadamente metade das neoplasias da mama são malignas (Macewen; Withrow, 1996; Sorenmo; Deanna; Goldsmith, 2013) e o carcinoma é o tipo histológico mais observado (Misdorp, 2002).

Os múltiplos fatores predisponentes para o desenvolvimento de TMCs são: raça, idade, genética, exposição hormonal, dieta e expressão de COX-2 (Nosalova *et al.*, 2024; Sorenmo *et al.*, 2011) (Imagem 11).

Imagem 11 - Fatores de risco para tumores mamários caninos.



Fonte: Nosalova *et al.* (2024).

3.9.2 Classificação histológica e grau histológico

A análise do comportamento biológico dos tumores pode ser feita através do tipo histológico, grau e expressão molecular. A combinação dessas características auxilia o veterinário na elaboração de uma estratégia terapêutica mais eficaz para o controle do tumor (Cassali *et al.*, 2020). Na medicina veterinária, diversos sistemas de classificação são usados para avaliar os TMCs (Nosalova *et al.*, 2024).

A avaliação histopatológica é altamente recomendada e essencial em todos os casos (Cassali *et al.*, 2020). A Organização Mundial da Saúde (OMS) oficializou a classificação histológica para TMCs, que foi utilizada globalmente por muitos anos (Misdorp; Else; Hellmén, 1999). Goldschmidt *et al.* (2011) desenvolveram um novo esquema de classificação abrangente, dividindo os TMCs em 23 subtipos malignos e 7 benignos. Este sistema de classificação foi atualizado pela OMS e pela Davis-Thompson DVM Foundation em 2019 (Papparella *et al.*, 2022).

Além dessa classificação, em 2011 Cassali e sua equipe publicaram o primeiro consenso com o objetivo de estabelecer critérios para nortear o diagnóstico, prognóstico e tratamento das neoplasias mamárias caninas e felinas (Cassali *et al.*, 2011). Desde então, outras quatro edições

foram publicadas, sendo a mais recente em 2024 (Cassali *et al.*, 2014, 2017, 2024; Cassali, G. D. *et al.*, 2020).

Com relação ao grau histológico, a graduação dos carcinomas invasivos em caninos segue os mesmos critérios propostos para mulheres, adaptado (Sorenmo; Deanna; Goldsmidt, 2013; Spugnini; Baldi, 2019).

3.9.3 Estadiamento clínico

O estadiamento clínico de cadelas com tumor na glândula mamária utiliza o sistema TNM, proposto pela OMS (Owen; Unit; Oncology, 1980) e adaptado por Sorenmo *et al.* (2013), que considera o tamanho do tumor (T), status do linfonodo regional (N) e presença de metástase distante (M) (**Error! Reference source not found.**). O TNM é importante para auxiliar o clínico veterinário a conhecer a extensão da lesão (Cassali *et al.*, 2014), determinar o prognóstico e instituir tratamento adequado (Sorenmo *et al.*, 2011).

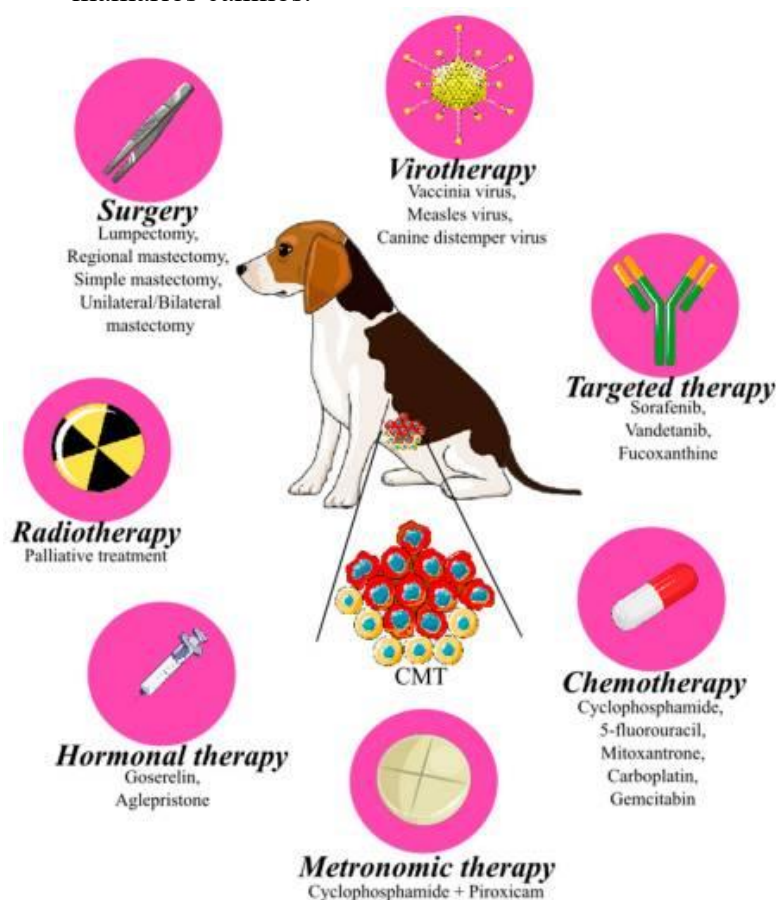
3.9.4 Fatores prognósticos e preditivos

O fator prognóstico é definido como uma ou mais características clínicas, patológicas e biológicas específicas dos indivíduos e seus tumores, o que possibilita a previsão da evolução clínica e da sobrevivência do paciente, sem que ele seja submetido a terapias adicionais após a cirurgia inicial. Marcadores preditivos permitem a seleção de pacientes para tratamentos mais específicos e individualizados (Cassali *et al.*, 2020).

3.9.5 Tratamentos

Atualmente, há diversas opções de tratamento disponíveis para cães portadores de TMCs (Imagem 12).

Imagem 12 - Estratégias terapêuticas para cães com tumores mamários caninos.



Fonte: Nosalova *et al.* (2024).

O tratamento de eleição é a cirurgia de excisão do tumor, que é considerada a modalidade mais eficaz para o controle regional do tumor e inclui a avaliação histológica (Nosalova *et al.*, 2024)

Cães com estadiamento mais baixo, tumores pequenos, não invasivos e bem localizados podem ser curados com cirurgia (Nosalova *et al.*, 2024) Além disso, o tratamento cirúrgico é mais eficaz em animais que não apresentam neoplasias agressivas e / ou metástases à distância (Horta *et al.*, 2014). Entretanto, não é adequada para cães com carcinoma inflamatório (Cassali *et al.*, 2020).

Apesar disso, remissões completas de tumores não incisáveis cirurgicamente, continuam infrequentes (Kiupel *et al.*, 2011; Wang; Lee; Liao, 2016) e não existe consenso sobre o melhor tipo de abordagem cirúrgica (Cassali *et al.*, 2020).

Um dos tratamentos adjuvantes disponíveis é a quimioterapia que pode ser aplicada em casos de TMCs com metástases ou inflamações, ou ainda como um tratamento complementar à cirurgia (Karayannopoulou *et al.*, 2001) No entanto, alguns quimioterápicos isolados ou

combinados não apresentaram resultados satisfatórios (Marconato *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2009). Já a radioterapia, na medicina veterinária, tem sido utilizada somente como tratamento complementar à cirurgia em cães com carcinoma metastático, bem como em pacientes com tumores que foram parcialmente removidos (Novosad, 2003).

Outra opção terapêutica é a inibição dos receptores hormonais (Cassali *et al.*, 2011). Contudo, alguns tratamentos não demonstraram atividade anticancerígena em cães, resultando apenas em efeitos colaterais (Morris; Dobson; Bostock, 1993). São necessários mais estudos sobre a terapia hormonal em cães com TMCs (Nosalova *et al.*, 2024).

Já a terapia metronômica consiste na administração contínua de baixas doses de medicamentos quimioterápicos em intervalos regulares, frequentemente sem pausas longas. Esta abordagem terapêutica é reconhecida por ser conveniente, econômica e apresentar riscos relativamente baixos, no entanto, a eficácia e segurança do tratamento demandam um monitoramento rigoroso dos pacientes (Mpekris *et al.*, 2022).

Na oncologia humana, um importante enfoque na terapia contra o câncer é o tratamento antiangiogênico utilizando anticorpos monoclonais (mAbs). Na veterinária, alguns mAbs foram testados *in vitro* para o câncer mamário canino, como o sorafenibe, com resultados promissores (Prado *et al.*, 2019).

Além dos medicamentos, a medicina personalizada, uma abordagem inovadora na oncologia humana, ainda não foi amplamente investigada no campo veterinário (Nosalova *et al.*, 2024). Um exemplo de terapia personalizada aplicada a cães envolve os inibidores de tirosina quinase, como o toceranib, que recebeu aprovação do FDA para tratar mastocitomas caninos (London, 2009). Gattino *et al.* (2018) demonstraram que o tratamento com toceranib reduziu a proliferação celular em linhagens de células mamárias neoplásicas caninas. Já as terapias imunoterapêuticas, como vacinas de DNA, mAbs e células T CAR, apresentam um potencial promissor como novas opções de tratamento para TMCs, contribuindo para o avanço da medicina personalizada (Nosalova *et al.*, 2024).

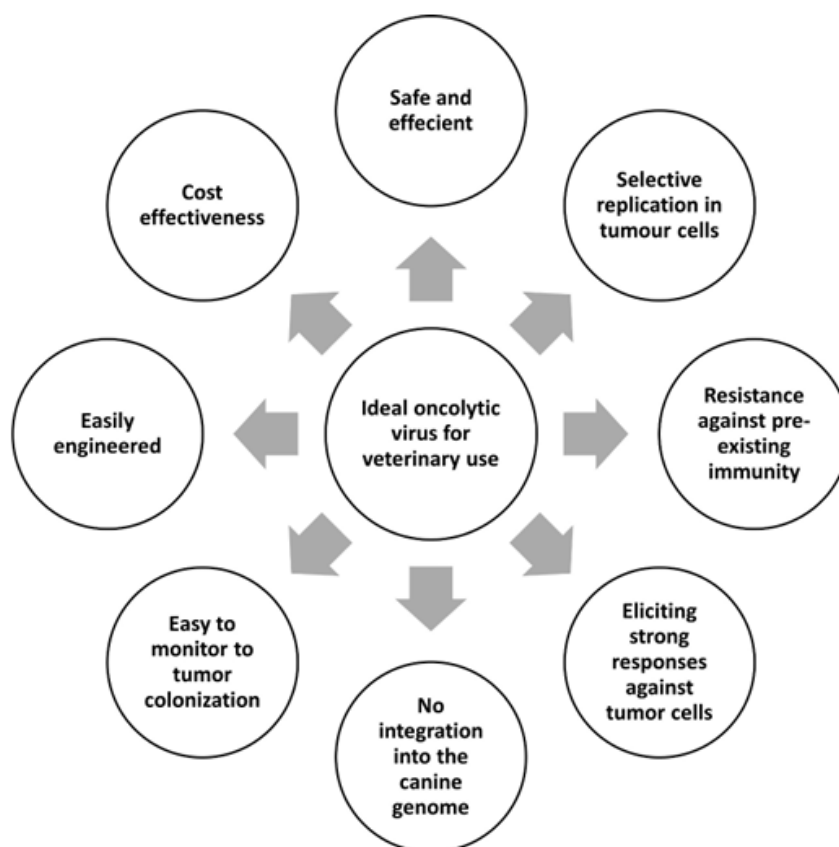
Por fim, VOs também podem ser usados como agentes anticâncer em caninos portadores de neoplasias.

4.0 Viroterapia para cães com câncer

Apesar dos VOs aprovados para tratar cânceres em humanos, nenhum foi aprovado na medicina veterinária até o momento. No entanto, diversos estudos estão em andamento para avaliar seus efeitos terapêuticos.

Patil *et al.* (2012) listaram as características desejáveis de um vírus oncolítico adequado para caninos (Imagem 13).

Imagem 13 - Características do vírus oncolítico ideal para uso veterinário.



Fonte: Patil *et al.* (2012).

Na medicina veterinária, vários modelos de tumores caninos e felinos foram tratados com cepas virais selvagens ou modificadas (Adelfinger *et al.*, 2014; Alcayaga-Miranda *et al.*, 2010; Gentshev *et al.*, 2009, 2012, 2013; Hemminki; Dos Santos; Hemminki, 2020; Hwang *et al.*, 2013; Jourdier *et al.*, 2003; Kanaya *et al.*, 2011; Le *et al.*, 2006; MacNeill *et al.*, 2012; Siddiqui *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2006; Suter *et al.*, 2005; Szalay *et al.*, 2010; Ternovoi *et al.*, 2005; Urbasic *et al.*, 2012; Westberg *et al.*, 2013).

4.0.1 Viroterapia com o uso do VDN em modelos caninos

As cepas do VDN de ocorrência natural, são VOs eficientes no tratamento de diversos modelos de tumor em animais (Sinkovics; Horvath, 2000), fato que os torna uma alternativa interessante para a oncologia veterinária (Sánchez *et al.*, 2018).

Sanchez *et al.* (2014) avaliaram o potencial linfólítico da vacina da cepa La Sota do VDN. Para a análise *in vitro*, utilizaram linfócitos saudáveis, humanos e caninos, bem como uma linhagem de linfoma de grandes células B humano (linhagem DHL4). Os pesquisadores observaram taxa de apoptose semelhante, tanto na linhagem DHL4 quanto nas expostas à tratamento quimioterápico e ambas foram superiores às linhagens controle. Já para a análise *in vivo*, um cão portador de linfoma cutâneo multicêntrico de células T agressivo de ocorrência natural, recebeu uma dose intratumoral e uma dose intravenosa de vacina. O animal apresentava quadro de paraplegia há 4 semanas, por infiltração neoplásica na coluna espinhal e múltiplas lesões cutâneas com tempo de evolução de três semanas. Durante o período de um mês de acompanhamento, não houve aparecimento de novas lesões e foi observado achatamento e diminuição do diâmetro das lesões pré-existentes. Adicionalmente, o canino apresentou ausência de toxicidade clínica evidente e evolução do quadro neurológico, voltando a abanar a cauda e a movimentar lentamente os membros posteriores.

Já Sánchez *et al.* (2016) avaliaram o efeito terapêutico da cepa lentogênica atenuada de baixa virulência, a VDN-MLS, *in vitro* e *in vivo*. Para a análise *in vitro*, foi avaliada a citotoxicidade da cepa do VDN, em amostra celular de linfoma de células B primário canino, a partir de um linfonodo com mais de 90 % de células tumorais. Ademais, foi utilizada a linhagem celular de linfoma de grandes células B humano, SU-DHL-4. Ambas foram comparadas com PBMCs (células mononucleares do sangue periférico) de cães e humanos saudáveis. Os pesquisadores observaram que a cepa VDN-MLS foi capaz de induzir morte celular por apoptose, reduzindo em 34 % (± 12 %) e 42 % (± 5 %) a sobrevivência celular na amostra canina e humana, respectivamente, quando comparados com os controles não tratados. Ademais, não foram observados efeitos significativos no PBMCs dos modelos saudáveis. Já para a análise *in vivo*, o estudo avaliou a biodistribuição precoce (24h) após única injeção intravenosa da cepa VDN-MLS, em um canino em estágio terminal, portador de linfoma de células T espontâneo, agressivo e incurável. Foi localizado vírus apenas na glândula salivar, no pulmão, no estômago e no rim, possivelmente devido a baixa toxicidade em tecidos normais de pacientes oncológicos. Adicionalmente, a microscopia eletrônica revelou que o VDN foi capaz de infectar células do linfoma maligno *in vivo* em cão.

Em 2017, King (2017) iniciou um ensaio clínico de fase I para avaliar a segurança e eficácia preliminar da administração intravenosa da cepa do VDN La Sota modificada rLAS-uPA, em cães com meningioma intracraniano. Quatro cães completaram o ensaio sem toxicidade significativa. Já em 2024, Rossmeisl *et al.* (2024) conduziram um ensaio de fase I/II onde foram administradas repetidas doses intravenosas da mesma cepa utilizada por King, em

20 cães com tumores intracranianos diversos. Foi observada redução no volume tumoral em 2 animais e, no geral, os pacientes apresentaram EA leves, como reações transitórias à infusão, diarreia e febre.

4.0.1.1 *Uso do VDN como adjuvante no tratamento de TMCs*

Até o momento, cinco estudos avaliaram o efeito *in vitro* e *in vivo* de diferentes cepas do VDN em mama canina. Rajmani *et al.* (2011) desenvolveram xenoenxertos de TMCs em seis camundongos albinos suíços, tratados com injeção intratumoral de VDN. Após 14 dias, os animais foram eutanasiados. No exame histopatológico do baço, foi observado efeito oncolítico. Nas PBMCs, foi observada efetiva resposta imune inata (proliferação de NK 18,2 %, em comparação a 6,5 % do grupo controle) e adaptativa (proliferação de CD8+ 24,4 %, em comparação a 15,4 % do grupo controle).

Já Das *et al.* (2017) selecionaram 12 cadelas com carcinomas mamários de grau III e metástase para os linfonodos regionais, diagnosticadas por PAAF (punção aspirativa por agulha fina); todas posteriormente foram submetidas à mastectomia. O grupo I foi composto por seis cadelas diagnosticadas com carcinoma em tumor misto (n=3), carcinoma tubular (n=1), carcinoma papilar (n=1), e carcinoma de células escamosas mamário (n=1); todas receberam quatro doses intravenosas da cepa velogênica VDN2K17 purificada, no pós-operatório. Já o grupo II foi composto por seis cadelas diagnosticadas com carcinoma em tumor misto (n=2), carcinoma tubular (n=2), e carcinoma papilar (n=2); no pós-operatório, nenhuma recebeu tratamento adjuvante com VDN. Todas as cadelas do grupo I apresentaram maior SG (sobrevida global MÉDIA S.E. $\pm$ 365 dias) e SLD (sobrevida livre de doença MÉDIA S.E. $\pm$ 365 dias), em relação ao grupo II (SG MÉDIA S.E. $\pm$ 283 dias; SLD MÉDIA S.E. $\pm$ 221 dias).

Em 2021, Santos *et al.* (2021) selecionaram duas linhagens celulares de neoplasias epiteliais mamárias caninas (E20, E37), três linhagens celulares de neoplasias mesenquimais mamárias caninas (M5, M25 e CF41.Mg) e uma linhagem celular não cancerígena (MDCK) e avaliaram a atividade antitumoral da cepa do VDN La Sota, lentogênica e não lítica, geneticamente modificada para expressar a proteína fluorescente verde GFP (VDN-GFP). As quatro linhagens celulares neoplásicas foram mais suscetíveis à infecção pelo VDN-GFP, em comparação à linhagem de células normais, pelo índice de seletividade ($\sim 3,1 \times$ a $\sim 78,7$). Entretanto, o efeito oncolítico foi claramente superior na linhagem mesenquimal neoplásica M5 (mais agressivas), quando comparada à linhagem tumoral de origem epitelial (E20). Além disso, evidenciou-se associação inversa da expressão da via do IFN e a suscetibilidade ao VDN-

GFP (a linhagem celular mais sensível [M5] expressou marcadamente menos IFN- β (interferon beta), quando comparada à linha mais resistente [E20]), demonstrando ser o mecanismo de destruição da célula tumoral predominante no experimento.

Já em 2023, Wang; Li; Li (2023) relataram que a cepa La Sota do VDN se reproduziu seletivamente em células CMT-U27 de carcinoma mamário canino, inibindo sua proliferação e migração, enquanto as células caninas normais (MDCK) não foram afetadas. Observou-se um aumento significativo na expressão de TNF α , p65 (subunidade da proteína complexo NF-kappaB [fator nuclear kappa B]), fosfo-p65 (forma fosforilada da subunidade p65 do complexo NF-kappaB), caspase-8, caspase-3 e PARP (poli [ADP-ribose] polimerase) no grupo tratado com VDN, sugerindo que o vírus induziu a apoptose por meio das vias de sinalização caspase-8/caspase-3 e TNF α /NF-Kb. Além disso, foi descrita redução significativa na taxa de crescimento tumoral em camundongos nude xenoenxertados com células CMT-U27 quando tratados com VDN.

Recentemente, Sánchez *et al.* (2024) conduziram um estudo de prova de conceito para investigar mais detalhadamente a cepa NDV-MLS do VDN como imunoterapia para câncer de mama canino. Seis cadelas com câncer mamário espontâneo receberam uma única injeção intravenosa e intratumoral de NDV-MLS oncolítico. Os infiltrados de células imunes foram avaliados por histologia e imunohistoquímica nos compartimentos estromal, intratumoral e peritumoral no sexto dia após a administração viral. Os pesquisadores um aumento no número de células imunes após o tratamento viral, principalmente no compartimento peritumoral, onde predominaram células plasmáticas e linfócitos CD3⁺ e CD3⁻/CD79⁻. A administração viral foi bem tolerada, sem EA significativos.

Assim sendo, a viroterapia com VDN é um candidato terapêutico promissor para cadelas portadoras de neoplasias mamárias agressivas, bem como tratamento adjuvante à mastectomia canina (Das *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2021).

4.0.1.2 Segurança e eventos adversos da viroterapia com vírus da doença de Newcastle em animais

Das *et al.* (2017) administraram injeções intravenosas de uma cepa do VDN em cadelas com tumores mamários de grau III e metástases para os linfonodos regionais e observaram que todos os animais desenvolveram febre ($104 \pm 0,5^{\circ}\text{F}$) e anorexia que durou de 3 a 4 dias após a primeira injeção. Conjuntivite leve foi observada em dois animais, que cedeu após terapia de suporte. Reduções no peso corporal também foram notadas em todas as cadelas durante o

período de terapia viral, normalizando após o término da viroterapia. No geral, todos os cães que receberam a terapia viral viveram durante o período do estudo sem qualquer dificuldade. Já King (2017) administrou injeções intravenosas de uma cepa LaSota modificada do VDN em um ensaio clínico de fase I em cães com meningioma intracraniano, e relatou que os animais apresentaram, em alguns casos, febre e diarreia (possivelmente associada à infecção). Três cães sofreram convulsões no período pós-infusão. Um dos pacientes progrediu para *status epilepticus* em menos de 12 horas após a conclusão da terceira infusão e o tutor do paciente solicitou a eutanásia. Entretanto, em alguns casos os episódios convulsivos relatados no estudo eram preexistentes e, nos demais, possivelmente associados ao diagnóstico de tumor cerebral. Efeitos adversos hematológicos e bioquímicos de grau 1 assintomáticos, como a elevações das enzimas hepáticas FAL-ALP e TGP-ALT, foram observados em todos os cães, mas foram atribuídos exclusivamente a medicamentos concomitantes com drogas antiepilépticas e corticosteroides. Todos os caninos tremeram intermitentemente durante as infusões, entretanto, os tremores não persistiram durante a infusão, nem após a administração. Estes tremores foram causados, provavelmente, devido à frieza do fluido intravenoso administrado (intervenção termorreguladora), bem como uma possível reação antígeno-anticorpo relacionada ao vírus de curta duração (Hirayama, 2013). Nenhum sinal possível de reação anafilática (urticária, vômito, edema) foi observado em qualquer cão, em qualquer momento durante o curso da infusão. Ademais, não houve toxicidade hematológica ou bioquímica significativa observada no ensaio.

REFERÊNCIAS

ABADIE, J. *et al.* Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 2: immunophenotypes and prognostic significance. **Breast Cancer Research and Treatment**, [s. l.], v. 167, n. 2, p. 459, 2017. ISSN: 15737217. DOI: <https://doi.org/10.1007/S10549-017-4542-8>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5790838/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

ABD-AZIZ, N.; STANBRIDGE, E. J.; SHAFEE, N. Newcastle Disease virus degrades HIF-1 α through proteasomal pathways independent of VHL and p53. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 97, n. 12, p. 3174–3182, 2016. ISSN: 0022-1317. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/jgv.0.000623>. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.000623>.

ADELFINER, M. *et al.* Evaluation of a new recombinant oncolytic vaccinia virus strain GLV-5b451 for feline mammary carcinoma therapy. **PloS one**, [s. l.], v. 9, n. 8, 2014. ISSN: 1932-6203. DOI: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0104337>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25093734/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

AFT, R. L.; ZHANG, F. W.; GIUS, D. Evaluation of 2-deoxy-D-glucose as a chemotherapeutic agent: mechanism of cell death. **British Journal of Cancer**, [s. l.], v. 87, n. 7, p. 805–812, 2002. ISSN: 0007-0920. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600547>. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/6600547>.

AGHI, M.; MARTUZA, R. L. Oncolytic viral therapies – the clinical experience. **Oncogene** **2005** **24**:52, [s. l.], v. 24, n. 52, p. 7802–7816, 2005. ISSN: 1476-5594. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209037>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/1209037>. Acesso em: 12 jan. 2025.

AHMAD, U. *et al.* Inhibitory and Apoptosis-Inducing Effects of Newcastle Disease Virus Strain AF2240 on Mammary Carcinoma Cell Line. **BioMed Research International**, [s. l.], 2015. ISSN: 2314-6133. DOI: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1155/2015/127828>. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/127828/>.

AHMED, I. *et al.* Induction of Nitric Oxide and TNF- α in Newcastle Disease Virus (NDV) AF2240 Infected RAW 264.7 Macrophages and their Cytotoxic Activity on MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Line. **Journal of Cancer Science & Therapy**, [s. l.], v. 06, n. 11, 2014. ISSN: 19485956. DOI: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4172/1948-5956.1000311>. Disponível em: <https://www.omicsonline.org/open-access/induction-of-nitric-oxide-and-tnf-in-newcastle-disease-virus-ndv-af-infected-raw-macrophages-1948-5956.1000311.php?aid=33952>.

ALABSI, A. M. *et al.* Anti-leukemic activity of Newcastle Disease virus strains AF2240 and V4-UPM in murine myelomonocytic leukemia in vivo. **Leukemia Research**, [s. l.], v. 36, n. 5, p. 634–645, 2012. ISSN: 01452126. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.leukres.2011.11.001>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0145212611005339>.

ALBERTS, P. *et al.* Long-term treatment with the oncolytic ECHO-7 virus Rigvir of a melanoma stage IV M1c patient, a small cell lung cancer stage IIIA patient, and a histiocytic sarcoma stage IV patient-three case reports. **APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, [s. l.], v. 124, n. 10, p. 896–904, 2016. ISSN: 1600-0463. DOI: <https://doi.org/10.1111/APM.12576>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27457663/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

ALCAYAGA-MIRANDA, F. *et al.* Osteosarcoma cells as carriers to allow antitumor activity of canine oncolytic adenovirus in the presence of neutralizing antibodies. **Cancer gene therapy**, [s. l.], v. 17, n. 11, p. 792–802, 2010. ISSN: 1476-5500. DOI: <https://doi.org/10.1038/CGT.2010.36>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20671769/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

ALEXANDER, D. J. Newcastle Disease in the European Union 2000 to 2009. **Avian Pathology**, [s. l.], v. 40, n. 6, p. 547–558, 2011. ISSN: 0307-9457. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/03079457.2011.618823>. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03079457.2011.618823>.

ALI, R. *et al.* Cytolytic effects and apoptosis induction of Newcastle Disease virus strain AF2240 on anaplastic astrocytoma brain tumor cell line. **Neurochemical Research**, [s. l.], v.

36, n. 11, p. 2051–2062, 2011. ISSN: 0364-3190. DOI:
<https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11064-011-0529-8>. Disponível em:
<http://link.springer.com/10.1007/s11064-011-0529-8>.

ALLEN, S. W.; PRASSE, K. W.; MAHAFFEY, E. A. Cytologic differentiation of benign from malignant canine mammary tumors. **Veterinary pathology**, [s. l.], v. 23, n. 6, p. 649–655, 1986. ISSN: 03009858. DOI:
<https://doi.org/https://doi.org/10.1177/030098588602300601>. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3811129/>.

AL-SHAMMARI, A. M. *et al.* 2-Deoxyglucose and Newcastle Disease Virus Synergize to Kill Breast Cancer Cells by Inhibition of Glycolysis Pathway Through Glyceraldehyde3-Phosphate Downregulation. **Frontiers in Molecular Biosciences**, [s. l.], v. 6, n. 90, p. 1–13, 2019. ISSN: 2296-889X. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00090>. Disponível em:
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmolb.2019.00090/full>.

AL-SHAMMARI, A. M. *et al.* Newcastle disease virus suppresses angiogenesis in mammary adenocarcinoma models. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, [s. l.], 2020. ISSN: 1311-1477. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.15547/BJVM.2020-0019>. Disponível em:
https://www.researchgate.net/publication/341984753_Newcastle_disease_virus_suppresses_angiogenesis_in_mammary_adenocarcinoma_models.

AL-ZIAYDI, A. G. *et al.* Hexokinase inhibition using D-Mannoheptulose enhances oncolytic Newcastle disease virus-mediated killing of breast cancer cells. **Cancer Cell International**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 1–10, 2020. ISSN: 14752867. DOI:
<https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s12935-020-01514-2>. Disponível em:
<https://doi.org/10.1186/s12935-020-01514-2>.

AMIN, Z. M. *et al.* Evaluation of a recombinant Newcastle Disease virus expressing human IL12 against human breast cancer. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 13999, 2019. ISSN: 2045-2322. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41598-019-50222-z>. Disponível em:
<http://www.nature.com/articles/s41598-019-50222-z>.

ANDRADE BRAGA, V. *et al.* Emotional Stress and Cardiovascular Complications in Animal Models: A Review of the Influence of Stress Type. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 7, p. 251, 2016. ISSN: 1664042X. DOI: <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2016.00251>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4919347/>. Acesso em: 7 fev. 2025.

ASSAYAGHI, R. M.; ALABSI, A. M.; ALI, A. M. Apoptosis induction of Newcastle Disease virus strains (AF 2240 & V4-UPM) on HT-29 Human colorectal adenocarcinoma cells. **JCRTO**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 1–5, 2016. ISSN: 23322403. DOI: <https://doi.org/10.17303/jcrto.2016.101>. Disponível em: <http://www.jscholaronline.org/full-text/JCRTO/5:101/Apoptosis-Induction-of-Newcastle-Disease-Virus-Strains.php>.

BAI, Y. *et al.* Newcastle Disease virus enhances the growth-inhibiting and proapoptotic effects of temozolomide on glioblastoma cells in vitro and in vivo. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, 2018. ISSN: 2045-2322. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41598-018-29929-y>. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-29929-y>.

BANDINELLI, M. B. *et al.* Ophthalmopathologic characterization of multicentric or metastatic neoplasms with an extraocular origin in dogs and cats. **Veterinary ophthalmology**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 814–827, 2020. ISSN: 1463-5224. DOI: <https://doi.org/10.1111/VOP.12803>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32687655/>. Acesso em: 8 fev. 2025.

BELL, J.; MCFADDEN, G. Viruses for Tumor Therapy. **Cell host & microbe**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 260, 2014. ISSN: 19346069. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2014.01.002>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3963258/>. Acesso em: 7 jan. 2025.

BIERMAN, H. R. *et al.* Remissions in leukemia of childhood following acute infectious disease: staphylococcus and streptococcus, varicella, and feline panleukopenias. **Cancer**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 591–605, 1953. ISSN: 10970142. DOI: [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1097-0142\(195305\)6:3<591::AID-CNCR2820060317>3.0.CO;2-M](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1097-0142(195305)6:3<591::AID-CNCR2820060317>3.0.CO;2-M). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13042782/>.

BILGIÇ, B.; DOKUZEYLÜL, B.; OR, M. E. Oncolytic virotherapy and the current approaches in veterinary medicine. **German Journal of Veterinary Research**, [s. l.], v. 2, n.

2, p. 17–27, 2022. ISSN: 27031322. DOI: <https://doi.org/10.51585/GJVR.2022.2.0032>.

Acesso em: 15 jan. 2025.

BINDEA, G. *et al.* Natural immunity to cancer in humans. **Current Opinion in Immunology**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 215–222, 2010. ISSN: 09527915. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.02.006>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952791510000385>.

BLUMING, AvrumZ.; ZIEGLER, JohnL. Regression of Burkitt's lymphoma in association with measles infection. **The Lancet**, [s. l.], v. 298, n. 7715, p. 105–106, 1971. ISSN: 01406736. DOI: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(71\)92086-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(71)92086-1). Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673671920861>.

BOMMAREDDY, P. K.; SHETTIGAR, M.; KAUFMAN, H. L. Integrating oncolytic viruses in combination cancer immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 18, n. 8, p. 498–513, 2018. ISSN: 1474-1733. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41577-018-0014-6>. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41577-018-0014-6>.

BRAY BSC, F. *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 74, n. 3, p. 229–263, 2024. ISSN: 1542-4863. DOI: <https://doi.org/10.3322/CAAC.21834>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21834>. Acesso em: 7 jan. 2025.

BURKE, S. *et al.* Oncolytic Newcastle disease virus activation of the innate immune response and priming of antitumor adaptive responses in vitro. **Cancer immunology, immunotherapy : CII**, [s. l.], v. 69, n. 6, p. 1015–1027, 2020. ISSN: 1432-0851. DOI: <https://doi.org/10.1007/S00262-020-02495-X>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32088771/>. Acesso em: 8 jan. 2025.

BURMAN, B.; PESCI, G.; ZAMARIN, D. Newcastle Disease virus at the forefront of cancer immunotherapy. **Cancers**, [s. l.], v. 12, 2020. ISSN: 2072-6694. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/cancers12123552>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/12/3552>.

CASSALI, G. D. *et al.* Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*.

http://www.abpv.vet.br/upload/documentos/DOWNLOAD-FULL-ARTICLE-29-20881_2011_7_11_14_42.pdf, [s. l.], 2011. ISSN: 1983-0246. Disponível em: <https://repositorio.ufba.br/handle/ri/5386>. Acesso em: 12 jan. 2025.

CASSALI, G. D. *et al.* **Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors-2013** *Braz J Vet Pathol*. [S. l.: s. n.], . Disponível em: www.bjvp.org.br.

CASSALI, G. D. *et al.* Consensus on the diagnosis, prognosis, and treatment of canine and feline mammary tumors: solid arrangement – 2023. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 152–163, 2024. ISSN: 19830246. DOI: <https://doi.org/10.24070/BJVP.1983-0246.V17I3P152-163>. Disponível em: <https://bjvp.org.br/v-17-n-3-28/>. Acesso em: 12 jan. 2025.

CASSALI, G. D. *et al.* Consensus Regarding the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine and Feline Mammary Tumors – 2019. **Braz. j. vet. pathol**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 555–574, 2020. ISSN: 19830246. DOI: <https://doi.org/10.24070/BJVP.1983-0246.V13I3P555-574>. Disponível em: <https://bjvp.org.br/wp-content/uploads/2020/11/v13-n3-1.pdf>. Acesso em: 13 jan. 2025.

CASSALI, G. *et al.* Consensus Regarding the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine and Feline Mammary Tumors - 2019. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 555–574, 2020. ISSN: 19830246. DOI: <https://doi.org/10.24070/bjvp.1983-0246.v13i3p555-574>. Disponível em: <http://bjvp.org.br/wp-content/uploads/2020/11/v13-n3-1.pdf>.

CASSALI, G. D. *et al.* Consensus regarding the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors: benign mixed tumors, carcinomas in mixed tumors and carcinosarcomas. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 87–99, 2017. ISSN: 19830246. DOI: <https://doi.org/10.24070/BJVP.1983-0246.V10I3P87-99>. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/002865861>. Acesso em: 13 jan. 2025.

CASSALI, G. D.; NAKAGAKI, K. Y. R. Anatomopatologia do tumor primário e linfonodos. *In: Patologia mamária canina e felina: do diagnóstico ao tratamento*. 2. ed., São Paulo: MedVet, 2023 a.

CASSALI, G. D.; NAKAGAKI, K. Y. R. Aspectos epidemiológicos das neoplasias mamárias em cadelas e gatas. . *In: Patologia mamária canina e felina: do diagnóstico ao tratamento*. 2. ed., São Paulo: MedVet, 2023 b. p. 43–55.

CASSALI, G. D.; NAKAGAKI, K. Y. R. Citopatologia mamária: técnicas de amostragem, interpretação e correlação cito-histológica. *In: Patologia mamária canina e felina: do diagnóstico ao tratamento*. 2. ed., São Paulo: MedVet, 2023 c. p. 65–94.

CASSEL, W. A.; GARRETT, R. E. Newcastle disease virus as an antineoplastic agent. **Cancer**, [s. l.], v. 18, n. 7, p. 863–868, 1965. ISSN: 0008-543X. DOI: [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1097-0142\(196507\)18:7<863::AID-CNCR2820180714>3.0.CO;2-V](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1097-0142(196507)18:7<863::AID-CNCR2820180714>3.0.CO;2-V). Disponível em: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142\(196507\)18:7%3C863::AID-CNCR2820180714%3E3.0.CO;2-V](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142(196507)18:7%3C863::AID-CNCR2820180714%3E3.0.CO;2-V).

CASSEL, W. A.; GARRETT, R. E. Tumor immunity after viral oncolysis. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 92, n. 3, 1966. ISSN: 0021-9193. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/JB.92.3.792-.1966>. Disponível em: <https://jlb.asm.org/content/92/3/792>.

CEJALVO, T. *et al.* Remission of Spontaneous Canine Tumors after Systemic Cellular Viroimmunotherapy. **Cancer Research**, [s. l.], v. 78, n. 17, p. 4891–4901, 2018. ISSN: 0008-5472. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-3754>. Disponível em: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-17-3754>.

CEKANOVA, M.; RATHORE, K. Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations. **Drug Design, Development and Therapy**, [s. l.], v. 8, p. 1911–1921, 2014. ISSN: 1177-8881. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.2147/DDDT.S49584>. Disponível em:

<http://www.dovepress.com/animal-models-and-therapeutic-molecular-targets-of-cancer-utility-and-peer-reviewed-article-DDDT>.

CHAMBERS, P. *et al.* Molecular cloning of complementary DNA to Newcastle Disease virus, and nucleotide sequence analysis of the junction between the genes encoding the Haemagglutinin-Neuraminidase and the large protein. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 67, n. 3, p. 475–486, 1986. ISSN: 0022-1317. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/0022-1317-67-3-475>. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-67-3-475>.

CH'NG, W. C. *et al.* Human renal carcinoma cells respond to Newcastle Disease virus infection through activation of the p38 MAPK/NF- κ B/I κ B α pathway. **Cellular Oncology**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 279–288, 2015. ISSN: 2211-3428. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s13402-015-0229-5>. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s13402-015-0229-5>.

COLETO, A. F.; FONSECA, B. B.; MEDEIROS-RONCHI, A. A. **Application of Newcastle Disease Virus in the Treatment of Human and Canine Mammary Cancer. Pakistan Veterinary Journal** 2024. (3) ISSN: 20747764. DOI: <https://doi.org/10.29261/pakvetj/2024.241>.

CSATARY, L. K. Viruses in the treatment of cancer. **The Lancet**, [s. l.], v. 298, n. 7728, 1971. ISSN: 01406736. DOI: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(71\)92788-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(71)92788-7). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4106650/>.

CUADRADO-CASTANO, S. *et al.* Enhancement of the proapoptotic properties of Newcastle Disease virus promotes tumor remission in syngeneic murine cancer models. **Molecular Cancer Therapeutics**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 1247–1258, 2015 a. ISSN: 1535-7163. DOI: <https://doi.org/http://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0913>. Disponível em: <http://mct.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1535-7163.MCT-14-0913>.

CUADRADO-CASTANO, S. *et al.* The therapeutic effect of death: Newcastle disease virus and its antitumor potential. **Virus research**, [s. l.], v. 209, p. 56, 2015 b. ISSN: 18727492.

DOI: <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2015.07.001>. Disponível em:
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4630136/>. Acesso em: 9 jan. 2025.

CZEGLÉDI, A. *et al.* Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. **Virus Research**, [s. l.], v. 120, n. 1–2, p. 36–48, 2006. ISSN: 01681702. DOI:
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.11.009>. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168170205003485>.

DAS, A. *et al.* Therapeutic potential of ndv-2k17 strain in canine mammary gland tumor. **International Journal of Chemical Studies**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 605–609, 2017. ISSN: 2349–8528. Disponível em: <https://www.chemijournal.com/archives/2017/vol5issue4/PartJ/5-3-168-620.pdf>.

DIAS, J. N. R. Diagnóstico imagiológico de metastização pulmonar : radiografia versus tomografia computadorizada. [s. l.], 2012. Disponível em:
<https://repositorio.ulisboa.pt/handle/10400.5/3986>. Acesso em: 1 fev. 2025.

DIMITROV, K. M. *et al.* Temporal, geographic, and host distribution of avian paramyxovirus 1 (Newcastle disease virus). **Infection, Genetics and Evolution**, [s. l.], v. 39, p. 22–34, 2016. ISSN: 15671348. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.01.008>.
Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134816300089>.

DIMITROV, K. M. *et al.* Updated unified phylogenetic classification system and revised nomenclature for Newcastle disease virus. **Infection, Genetics and Evolution**, [s. l.], v. 74, p. 103917, 2019. ISSN: 15677257. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2019.103917>.
Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6876278/>. Acesso em: 9 jan. 2025.

DORTMANS, J. C. *et al.* Virulence of Newcastle Disease virus: what is known so far? **Veterinary Research**, [s. l.], v. 42, n. 1, 2011. ISSN: 1297-9716. DOI:
<https://doi.org/https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-122>. Disponível em:
<http://www.veterinaryresearch.org/content/42/1/122>.

DUBOIS, E. *et al.* Intra-laboratory validation of a concentration method adapted for the enumeration of infectious F-specific RNA coliphage, enterovirus, and hepatitis A virus from inoculated leaves of salad vegetables. **International journal of food microbiology**, [s. l.], v. 108, n. 2, p. 164–171, 2006. ISSN: 0168-1605. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2005.11.007>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16387377/>. Acesso em: 5 fev. 2025.

DUFFY, M. R.; FISHER, K. D.; SEYMOUR, L. W. Making Oncolytic Virotherapy a Clinical Reality: The European Contribution. **Human Gene Therapy**, [s. l.], v. 28, n. 11, p. 1033–1046, 2017. ISSN: 1043-0342. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1089/hum.2017.112>. Disponível em: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/hum.2017.112>.

ELANKUMARAN, S.; ROCKEMANN, D.; SAMAL, S. K. Newcastle Disease virus exerts oncolysis by both intrinsic and extrinsic caspase-dependent pathways of cell death. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 80, n. 15, p. 7522–7534, 2006. ISSN: 0022-538X. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/JVI.00241-06>. Disponível em: <https://jvi.asm.org/content/80/15/7522>.

EL-SAYED, A.; HARASHIMA, H. Endocytosis of Gene Delivery Vectors: From Clathrin-dependent to Lipid Raft-mediated Endocytosis. **Molecular Therapy**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 1118, 2013. ISSN: 15250024. DOI: <https://doi.org/10.1038/MT.2013.54>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3677298/>. Acesso em: 12 jan. 2025.

EMA. **Imlygic. Talimogene Laherparepvec**. 2016. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/imlygic>.

FAN, X. *et al.* Overexpression of p53 delivered using recombinant NDV induces apoptosis in glioma cells by regulating the apoptotic signaling pathway. **Experimental and Therapeutic Medicine**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 4522–4530, 2018. ISSN: 1792-0981. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.3892/etm.2018.5935>; Disponível em: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2018.5935>.

FELDMAN, E. R. *et al.* Phase II trial of recombinant tumor necrosis factor in disseminated malignant melanoma. **American journal of clinical oncology**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 256–259,

1992. ISSN: 0277-3732. DOI: <https://doi.org/10.1097/00000421-199206000-00015>.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1590281/>. Acesso em: 12 jan. 2025.

FERRONE, C.; DRANOFF, G. Dual roles for immunity in gastrointestinal cancers. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 28, n. 26, p. 4045–4051, 2010. ISSN: 0732-183X. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1200/JCO.2010.27.9992>. Disponível em: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2010.27.9992>.

FLANAGAN, A. D.; LOVE, R.; TESAR, W. Propagation of Newcastle Disease virus in Ehrlich ascites cells in vitro and in vivo. **Experimental Biology and Medicine**, [s. l.], v. 90, n. 1, p. 82–86, 1955. ISSN: 1535-3702. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.3181/00379727-90-21945>. Disponível em: <http://ebm.sagepub.com/lookup/doi/10.3181/00379727-90-21945>.

FLEMING, J. M.; CREEVY, K. E.; PROMISLOW, D. E. L. Mortality in north american dogs from 1984 to 2004: an investigation into age-, size-, and breed-related causes of death. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 187–198, 2011. ISSN: 08916640. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.0695.x>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21352376/>.

FORD, R. B. .; MAZZAFERRO, Elisa. **Kirk & Bistner Manual de Procedimentos Veterinários e Tratamento Emergencial**. 9. ed., [s. l.], : GEN Guanabara Koogan, 2013. 767 p. ISBN: 8535254358. Acesso em: 3 fev. 2025.

FOUNTZILAS, C.; PATEL, S.; MAHALINGAM, D. Review: oncolytic virotherapy, updates and future directions. **Oncotarget**, [s. l.], v. 8, n. 60, p. 617–639, 2017. ISSN: 1949-2553. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.18632/oncotarget.18309>. Disponível em: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.18309>.

FRAMPTON, J. E. Teserpaturev/G47Δ: First Approval. **BioDrugs**, [s. l.], v. 36, n. 5, p. 667–672, 2022. ISSN: 1179190X. DOI: <https://doi.org/10.1007/S40259-022-00553-7/METRICS>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40259-022-00553-7>. Acesso em: 6 jan. 2025.

FREEMAN, A. I. *et al.* Phase I/II trial of intravenous NDV-HUJ oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme. **Molecular Therapy**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 221–228, 2006. ISSN: 15250016. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.08.016>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1525001605015704>.

FUERTES, M. B. *et al.* Host type I IFN signals are required for antitumor CD8⁺ T cell responses through CD8 α ⁺ dendritic cells. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 208, n. 10, p. 2005–2016, 2011. ISSN: 1540-9538. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1084/jem.20101159>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3182064/>.

FULBER, J. P. C.; KAMEN, A. A. Development and Scalable Production of Newcastle Disease Virus-Vectored Vaccines for Human and Veterinary Use. **Viruses**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 975, 2022. ISSN: 19994915. DOI: <https://doi.org/10.3390/V14050975>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9143368/>. Acesso em: 12 jan. 2025.

FÜRDÖS, I. *et al.* Translating clinical trials from human to veterinary oncology and back. **Journal of Translational Medicine**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 265, 2015. ISSN: 14795876. ISBN: 1296701506319. DOI: <https://doi.org/10.1186/S12967-015-0631-9>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4536666/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

GANAR, K. *et al.* Newcastle disease virus: Current status and our understanding. **Virus Research**, [s. l.], v. 184, p. 71–81, 2014. ISSN: 01681702. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.02.016>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016817021400080X>.

GARBER, K. China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment. **Journal of the National Cancer Institute**, [s. l.], v. 98, n. 5, p. 298–300, 2006. ISSN: 14602105. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/jnci/djj111>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16507823/>.

GATTINO, F. *et al.* PDGFR- α , PDGFR- β , VEGFR-2 and CD117 expression in canine mammary tumours and evaluation of the in vitro effects of toceranib phosphate in neoplastic mammary cell lines. **The Veterinary record**, [s. l.], v. 183, n. 7, p. 221, 2018. ISSN: 2042-

7670. DOI: <https://doi.org/10.1136/VR.104414>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29440590/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

GE, J. *et al.* Newcastle Disease Virus-Vectored Rabies Vaccine Is Safe, Highly Immunogenic, and Provides Long-Lasting Protection in Dogs and Cats. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 85, n. 16, p. 8241, 2011. ISSN: 0022-538X. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00519-11>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3147977/>. Acesso em: 12 jan. 2025.

GE, J. *et al.* Recombinant Newcastle disease viral vector expressing hemagglutinin or fusion of canine distemper virus is safe and immunogenic in minks. **Vaccine**, [s. l.], v. 33, n. 21, p. 2457–2462, 2015. ISSN: 1873-2518. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2015.03.091>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25865465/>. Acesso em: 12 jan. 2025.

GENTSCHEV, I. *et al.* Characterization and evaluation of a new oncolytic Vaccinia Virus strain LIVP6.1.1 for canine cancer therapy. **Bioengineered**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 84, 2013. ISSN: 19491026. DOI: <https://doi.org/10.4161/BIOE.22462>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3609626/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

GENTSCHEV, I. *et al.* Preclinical Evaluation of Oncolytic Vaccinia Virus for Therapy of Canine Soft Tissue Sarcoma. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. e37239, 2012. ISSN: 19326203. DOI: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0037239>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3352892/>. Acesso em: 14 jan. 2025.

GENTSCHEV, I. *et al.* Use of an oncolytic vaccinia virus for the treatment of canine breast cancer in nude mice: preclinical development of a therapeutic agent. **Cancer gene therapy**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 320–328, 2009. ISSN: 1476-5500. DOI: <https://doi.org/10.1038/CGT.2008.87>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18949014/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

GHRICI, M. *et al.* Induction of apoptosis in MCF-7 cells by the Hemagglutinin-Neuraminidase glycoprotein of Newcastle Disease virus malaysian strain AF2240. **Oncology Reports**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 1035–1044, 2013 a. ISSN: 1021-335X. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.3892/or.2013.2573>. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2013.2573>.

GHRICI, M. *et al.* Newcastle disease virus Malaysian strain AF2240 induces apoptosis in MCF-7 human breast carcinoma cells at an early stage of the virus life cycle. **International Journal of Molecular Medicine**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 525–532, 2013 b. ISSN: 1107-3756. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1244>. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2013.1244>.

GLICKMAN, R. L. *et al.* Quantitative basic residue requirements in the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein as a determinant of virulence for Newcastle disease virus. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 62, n. 1, p. 354–356, 1988. ISSN: 0022-538X. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/jvi.62.1.354-356.1988>. Disponível em: <https://jvi.asm.org/content/62/1/354>.

GOLDSCHMIDT, M. H. *et al.* Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary pathology**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 117–131, 2011. ISSN: 1544-2217. DOI: <https://doi.org/10.1177/0300985810393258>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21266722/>. Acesso em: 12 jan. 2025.

GOLDSCHMIDT, M. H.; PEÑA, L.; ZAPPULLI, V. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D. J. (org.). **Tumors in Domestic Animals**. 5. ed., Raleigh, NC, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2017. p. 723–765. ISBN: 9781119181200. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119181200>.

GRAAF, J. F. *et al.* Determinants of the efficacy of viro-immunotherapy: a review. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, [s. l.], v. 56, p. 124–132, 2020. ISSN: 13596101. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2020.07.001>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359610120301477>.

GROSS, S. MEASLES AND LEUKÆMIA. **The Lancet**, [s. l.], v. 297, n. 7695, p. 397–398, 1971. ISSN: 01406736. DOI: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(71\)92232-x](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0140-6736(71)92232-x). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4100233/>.

GUJAR, S.; POL, J. G.; KROEMER, G. Heating it up: Oncolytic viruses make tumors “hot” and suitable for checkpoint blockade immunotherapies. **Oncoimmunology**, [s. l.], v. 7, n. 8,

2018. ISSN: 2162-4011. DOI: <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1442169>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30221036/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

GUO, T. *et al.* A recombinant Newcastle disease virus expressing MMP8 promotes oncolytic efficacy. **Chinese Chemical Letters**, [s. l.], v. 32, n. 12, p. 3962–3966, 2021. ISSN: 10018417. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.CCLET.2021.05.001>. Acesso em: 1 fev. 2025.

HANAHAHAN, D. **Hallmarks of Cancer: New Dimensions**. **Cancer Discovery** American Association for Cancer Research Inc., 2022. (1) ISSN: 21598290. DOI: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, [s. l.], v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. ISSN: 1097-4172. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.02.013>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21376230/>. Acesso em: 8 jan. 2025.

HANSEN, K.; KHANNA, C. Spontaneous and genetically engineered animal models: use in preclinical cancer drug development. **European Journal of Cancer**, [s. l.], v. 40, n. 6, p. 858–880, 2004. ISSN: 0959-8049. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejca.2003.11.031>. Disponível em: <http://www.ejcancer.com/article/S0959804904000498/fulltext>.

HASSAN, S. A. H.; ALLAWI, A. B.; AL-SHAMMARI, A. M. In Vitro Oncolytic activity of non-virulent Newcastle Disease Virus LaSota Strain against Mouse mammary adenocarcinoma. **Iraqi Journal of Science**, [s. l.], v. 61, n. 2, p. 285–294, 2020. ISSN: 2312-1637. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.24996/ijcs.2020.61.2.5>. Disponível em: <http://scbaghdad.edu.iq/eijs/index.php/eijs/article/view/1531>.

HASSAN, S. A. H.; AL-SHAMMARI, A. M.; ALLAWI, A. B. Oncolytic effect of non-virulent Newcastle Disease virus LaSota strain in human breast cancer cell lines in vitro. **Biochemical and Cellular Archives**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 1013–1022, 2020. ISSN: 09761772. DOI: <https://doi.org/10.35124/bca.2020.20.1.1013>. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/343240554_Oncolytic_effect_of_non-

virulent_Newcastle_disease_virus_lasota_strain_in_human_breast_cancer_cell_lines_in_vitro

HE, J. *et al.* Newcastle disease virus chimeras expressing the Hemagglutinin- Neuraminidase protein of mesogenic strain exhibits an enhanced anti-hepatoma efficacy. **Virus Research**, [s. l.], v. 221, p. 23–29, 2016. ISSN: 18727492. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.04.023>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27164362/>.

HEGDE, P. S.; KARANIKAS, V.; EVERS, S. The where, the when, and the how of immune monitoring for cancer immunotherapies in the era of checkpoint inhibition. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 22, n. 8, p. 1865–1874, 2016. ISSN: 1078-0432. DOI: <https://doi.org/https://scite.ai/reports/10.1158/1078-0432.ccr-15-1507>. Disponível em: <http://clincancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1078-0432.CCR-15-1507>.

HEMMINKI, O.; DOS SANTOS, J. M.; HEMMINKI, A. Oncolytic viruses for cancer immunotherapy. **Journal of Hematology & Oncology**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 84, 2020. ISSN: 17568722. DOI: <https://doi.org/10.1186/S13045-020-00922-1>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7325106/>. Acesso em: 7 jan. 2025.

HIRAYAMA, F. Current understanding of allergic transfusion reactions: incidence, pathogenesis, laboratory tests, prevention and treatment. **British journal of haematology**, [s. l.], v. 160, n. 4, p. 434–444, 2013. ISSN: 1365-2141. DOI: <https://doi.org/10.1111/BJH.12150>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23215650/>. Acesso em: 16 jan. 2025.

HORTA, R. dos S. *et al.* Influence of Surgical Technique on Overall Survival, Disease Free Interval and New Lesion Development Interval in Dogs with Mammary Tumors. **Advances in Breast Cancer Research**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 38–46, 2014. ISSN: 2168-1589. DOI: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4236/abcr.2014.32006>. Disponível em: <http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/abcr.2014.32006>.

HOTTE, S. J. *et al.* An optimized clinical regimen for the oncolytic virus PV701. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**,

[s. l.], v. 13, n. 3, p. 977–985, 2007. ISSN: 1078-0432. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1817>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17289893/>. Acesso em: 12 jan. 2025.

HU, L. *et al.* Targeting autophagy for oncolytic immunotherapy. **Biomedicines**, [s. l.], v. 5, n. 4, 2017. ISSN: 2227-9059. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/biomedicines5010005>. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2227-9059/5/1/5>.

HUNTER, T.; LLERA, R.; WARD, E. **Anemia in Dogs | VCA Animal Hospitals**. 2023. Disponível em: <https://vcahospitals.com/know-your-pet/anemia-in-dogs>. Acesso em: 8 fev. 2025.

HWANG, C. C. *et al.* Oncolytic reovirus in canine mast cell tumor. **PloS one**, [s. l.], v. 8, n. 9, 2013. ISSN: 1932-6203. DOI: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0073555>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24073198/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

ICTV. **Mononegavirales - Negative Sense RNA Viruses**. 2011. Disponível em: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/negative-sense-rna-viruses-2011/w/negrna_viruses/194/mononegavirales.

INSTITUTO BUTANTAN. **ButanVac não atinge desfecho esperado e Butantan interrompe seu desenvolvimento - Instituto Butantan**. 2024. Disponível em: <https://butantan.gov.br/noticias/butanvac-nao-atinge-desfecho-esperado-e-butan-tan-interrompe-seu-desenvolvimento>. Acesso em: 12 jan. 2025.

IORIO, R. M. *et al.* Structural and Functional Relationship between the Receptor Recognition and Neuraminidase Activities of the Newcastle Disease Virus Hemagglutinin-Neuraminidase Protein: Receptor Recognition Is Dependent on Neuraminidase Activity. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 75, n. 4, p. 1918, 2001. ISSN: 0022-538X. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.75.4.1918-1927.2001>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC115138/>. Acesso em: 12 jan. 2025.

JARAHIAN, M. *et al.* Activation of natural killer cells by newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase. **Journal of virology**, [s. l.], v. 83, n. 16, p. 8108–8121, 2009.

ISSN: 1098-5514. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00211-09>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19515783/>. Acesso em: 10 jan. 2025.

JAVANBAKHT, M. *et al.* Oncolytic viruses: a novel treatment strategy for breast cancer. **Genes & Diseases**, [s. l.], 2021. ISSN: 2352-3042. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gendis.2021.11.011>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352304221001616>.

Jl, Y. *et al.* Two single mutations in the fusion protein of Newcastle disease virus confer hemagglutinin-neuraminidase independent fusion promotion and attenuate the pathogenicity in chickens. **Virology**, [s. l.], v. 509, p. 146–151, 2017. ISSN: 00426822. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.06.021>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682217301976>.

JIN, K.-T. *et al.* Crosstalk between oncolytic viruses and autophagy in cancer therapy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 134, 2021. ISSN: 07533322. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110932>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332220311240>.

JOURDIER, T. M. *et al.* Local immunotherapy of spontaneous feline fibrosarcomas using recombinant poxviruses expressing interleukin 2 (IL2). **Gene therapy**, [s. l.], v. 10, n. 26, p. 2126–2132, 2003. ISSN: 0969-7128. DOI: <https://doi.org/10.1038/SJ.GT.3302124>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14625567/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

KALID, M. *et al.* Gene expression profiling in apoptotic MCF-7 cells infected with Newcastle Disease virus. **Global Veterinaria**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 334–340, 2010. ISSN: 1992-6197. Disponível em: [https://idosi.org/gv/gv5\(6\)10/7.pdf](https://idosi.org/gv/gv5(6)10/7.pdf).

KALYANASUNDRAM, J. *et al.* Newcastle Disease virus strain AF2240 as an oncolytic virus: a review. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 183, p. 126–133, 2018. ISSN: 0001706X. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.04.007>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X18301840>.

KAN, X. *et al.* Newcastle-disease-virus-induced ferroptosis through nutrient deprivation and ferritinophagy in tumor cells. **iScience**, [s. l.], v. 24, n. 8, 2021. ISSN: 2589-0042. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102837>.

KANAYA, N. *et al.* Anti-tumor effect of adenoviral vector-mediated p53 gene transfer on the growth of canine osteosarcoma xenografts in nude mice. **The Journal of veterinary medical science**, [s. l.], v. 73, n. 7, p. 877–883, 2011. ISSN: 1347-7439. DOI: <https://doi.org/10.1292/JVMS.10-0570>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21350316/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

KARAYANNOPOULOU, M. *et al.* Adjuvant post-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer. **Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine**, [s. l.], v. 48, n. 2, p. 85–96, 2001. ISSN: 0931-184X. DOI: <https://doi.org/10.1046/J.1439-0442.2001.00336.X>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11315572/>. Acesso em: 13 jan. 2025.

KEMP, V. *et al.* Developing oncolytic viruses for clinical use: a consortium approach. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, [s. l.], v. 56, p. 133–140, 2020. ISSN: 13596101. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2020.06.010>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359610120301453>.

KERKAR, S. P.; RESTIFO, N. P. **Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment. Cancer Research** 2012. (13) ISSN: 00085472. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-4094>.

KESHAVARZ, M. *et al.* Oncolytic Newcastle disease virus reduces growth of cervical cancer cell by inducing apoptosis. **Saudi journal of biological sciences**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 47–52, 2020. ISSN: 1319-562X. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2019.04.015>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31889816/>. Acesso em: 15 maio. 2022.

KIM, R.; EMI, M.; TANABE, K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. **Immunology**, [s. l.], v. 121, n. 1, p. 1–14, 2007. ISSN: 00192805. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2265921/>.

KING, J. N. **Phase I Clinical Trial of Recombinant Oncolytic Newcastle Disease Virus for Intracranial Meningioma**. 2017. Master of Science in Biomedical and Veterinary Sciences - Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, [s. l.], 2017.

KIUPEL, M. *et al.* Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. **Veterinary Pathology**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 147–155, 2011. ISSN: 15442217. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1177/0300985810386469>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21062911/>.

KOKS, C. A. *et al.* Newcastle disease virotherapy induces long-term survival and tumor-specific immune memory in orthotopic glioma through the induction of immunogenic cell death. **International Journal of Cancer**, [s. l.], v. 136, n. 5, p. 313–325, 2015. ISSN: 0020-7136. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ijc.29202>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.29202>.

KOL, A. *et al.* Companion animals: Translational scientist's new best friends. **Science translational medicine**, [s. l.], v. 7, n. 308, 2015. ISSN: 1946-6242. DOI: <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.AAA9116>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26446953/>. Acesso em: 4 fev. 2025.

KRZYSZCZYK, P. *et al.* The growing role of precision and personalized medicine for cancer treatment. **Technology**, [s. l.], v. 6, n. 3–4, p. 79, 2019. ISSN: 2339-5478. DOI: <https://doi.org/10.1142/S2339547818300020>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6352312/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

KWON, J. Y. *et al.* Canine as a Comparative and Translational Model for Human Mammary Tumor. **Journal of Breast Cancer**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 1, 2023. ISSN: 20929900. DOI: <https://doi.org/10.4048/JBC.2023.26.E4>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9981990/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

LAM, H. Y. *et al.* Safety and clinical usage of newcastle disease virus in cancer therapy. **Journal of biomedicine & biotechnology**, [s. l.], v. 2011, 2011. ISSN: 1110-7251. DOI:

<https://doi.org/10.1155/2011/718710>. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22131816/>. Acesso em: 12 jan. 2025.

LAMB, R. A.; PARKS, G. D. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: BN, F.; DM, K.; PM, H. (org.). **Fields Virology**. 5. ed., Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1449–1496. Disponível em: <https://www.scholars.northwestern.edu/en/publications/paramyxoviridae-the-viruses-and-their-replication-2>.

LAURIE, S. A. *et al.* A phase 1 clinical study of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, using two-step desensitization. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, [s. l.], v. 12, n. 8, p. 2555–2562, 2006. ISSN: 1078-0432. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2038>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16638865/>. Acesso em: 9 jan. 2025.

LE, L. P. *et al.* Infectivity enhancement for adenoviral transduction of canine osteosarcoma cells. **Gene therapy**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 389–399, 2006. ISSN: 0969-7128. DOI: <https://doi.org/10.1038/SJ.GT.3302674>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16292351/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

LEBLANC, A. K. *et al.* Veterinary Cooperative Oncology Group—Common Terminology Criteria for Adverse Events (VCOG-CTCAE v2) following investigational therapy in dogs and cats. **Veterinary and Comparative Oncology**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 311, 2021. ISSN: 14765829. DOI: <https://doi.org/10.1111/VCO.12677>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8248125/>. Acesso em: 3 fev. 2025.

LEEuw, O. S. *et al.* Virulence of Newcastle Disease virus is determined by the cleavage site of the fusion protein and by both the stem region and globular head of the Haemagglutinin–Neuraminidase protein. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 86, n. 6, p. 1759–1769, 2005. ISSN: 0022-1317. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/vir.0.80822-0>. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.80822-0>.

LI, J. *et al.* Mutated form of the Newcastle Disease virus Hemagglutinin–Neuraminidase interacts with the homologous fusion protein despite deficiencies in both receptor recognition

and fusion promotion. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 78, n. 10, p. 5299–5310, 2004. ISSN: 0022-538X. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/JVI.78.10.5299-5310.2004>. Disponível em: <https://jvi.asm.org/content/78/10/5299>.

LI, Y. *et al.* **Oncolytic virotherapy in hepato-bilio-pancreatic cancer: The key to breaking the log jam?** **Cancer Medicine** Blackwell Publishing Ltd, 2020. (9) ISSN: 20457634. DOI: <https://doi.org/10.1002/cam4.2949>.

LI, P. *et al.* Therapeutic effects of a fusogenic newcastle disease virus in treating head and neck cancer. **Head & Neck**, [s. l.], v. 33, n. 10, p. 1394–1399, 2011. ISSN: 10433074. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/hed.21609>. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/hed.21609>.

LIN, D.; SHEN, Y.; LIANG, T. **Oncolytic virotherapy: basic principles, recent advances and future directions.** **Signal Transduction and Targeted Therapy** Springer Nature, 2023. (1) ISSN: 20593635. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01407-6>.

LIU, L. Fields Virology, 6th Edition. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 59, n. 4, 2014. ISSN: 1058-4838. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/cid/ciu346>. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/ciu346>.

LIU, T. *et al.* Hemagglutinin–Neuraminidase and fusion genes are determinants of NDV thermostability. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 228, p. 53–60, 2019. ISSN: 03781135. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.11.013>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113518309076>.

LOHMUELLER, J.; FINN, O. J. Current modalities in cancer immunotherapy: immunomodulatory antibodies, CARs and vaccines. **Pharmacology & Therapeutics**, [s. l.], v. 178, p. 31–47, 2017. ISSN: 01637258. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.03.008>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725817300888>.

LONDON, C. A. Tyrosine kinase inhibitors in veterinary medicine. **Topics in companion animal medicine**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 106–112, 2009. ISSN: 1938-9736. DOI:

<https://doi.org/10.1053/J.TCAM.2009.02.002>. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19732728/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

LORENCE, R. M. *et al.* Complete Regression of Human Neuroblastoma Xenografts in Athymic Mice After Local Newcastle Disease Virus Therapy. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, [s. l.], v. 86, n. 16, p. 1228–1233, 1994. ISSN: 0027-8874. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/jnci/86.16.1228>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/86.16.1228>.

MACEWEN, E. G.; WITHROW, S. Tumors of the mammary gland. *In*: WITHROW, Stephen. J.; MACEWEN, E. G.; VAIL, David. M. (org.). **Small Animal Oncology**. 2. ed., Philadelphia: Saunders Company, 1996. p. 356–372. ISBN: 978-0721677552. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.1996.tb01425.x>.

MACNEILL, A. L. *et al.* Myxoma virus induces apoptosis in cultured feline carcinoma cells. **Research in veterinary science**, [s. l.], v. 93, n. 2, p. 1036–1038, 2012. ISSN: 1532-2661. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2011.10.016>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22100245/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

MARCONATO, L. *et al.* Adjuvant gemcitabine after surgical removal of aggressive malignant mammary tumours in dogs. **Veterinary and comparative oncology**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 90–101, 2008. ISSN: 1476-5829. DOI: <https://doi.org/10.1111/J.1476-5829.2007.00143.X>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19178668/>. Acesso em: 13 jan. 2025.

MARTINEZ, C. *et al.* Evaluation of red blood cell distribution width in dogs with various illnesses. **The Canadian Veterinary Journal**, [s. l.], v. 60, n. 9, p. 964, 2019. ISSN: 00085286. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6697020/>. Acesso em: 7 fev. 2025.

MARTINI, V. *et al.* Oncolytic virotherapy: new weapon for breast cancer treatment. **ecancermedicalscience**, [s. l.], v. 14, n. 1149, p. 1–19, 2020. ISSN: 17546605. ISBN: 0000000283427. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.3332/ecancer.2020.1149>. Disponível

em: <https://ecancer.org/en/journal/article/1149-oncolytic-virotherapy-new-weapon-for-breast-cancer-treatment>.

MATSUDA, T.; KARUBE, H.; ARUGA, A. A Comparative Safety Profile Assessment of Oncolytic Virus Therapy Based on Clinical Trials. **Therapeutic innovation & regulatory science**, [s. l.], v. 52, n. 4, p. 430–437, 2018. ISSN: 2168-4804. DOI: <https://doi.org/10.1177/2168479017738979>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29714547/>. Acesso em: 12 jan. 2025.

MEBATSION, T.; WEILAND, F.; CONZELMANN, K.-K. Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 73, n. 1, p. 242–250, 1999. ISSN: 1098-5514. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/JVI.73.1.242-250.1999>. Disponível em: <https://jvi.asm.org/content/73/1/242>.

MENDONÇA, D. A. *et al.* Risk of arrhythmias in dogs with structural heart disease. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 42, p. e07153, 2022. ISSN: 0100-736X. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-7153>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pvb/a/wbhVwgmDLGvz8Hj55gkdSHL/>. Acesso em: 26 abr. 2025.

MENG, G. *et al.* Fludarabine as an adjuvant improves Newcastle Disease virus-mediated antitumor immunity in hepatocellular carcinoma. **Molecular Therapy - Oncolytics**, [s. l.], v. 13, p. 22–34, 2019. ISSN: 23727705. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.omto.2019.03.004>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2372770519300348>.

MEYER, D. J.; HARVEY, J. W. **Veterinary laboratory medicine : interpretation & diagnosis**. 2. ed., Philadelphia: Saunders, 2004. 351 p. ISBN: 9780721689265. Acesso em: 19 fev. 2025.

MEYYAPPAN, N. **Oncolytic effect of Newcastle Disease virus on the MCF-7 and MDAMB-231 breast cancer cell lines**. 2003. 25 f. Degree of Master of Science - Universiti Putra Malaysia, [s. l.], 2003. Disponível em: <https://core.ac.uk/reader/43001050>.

MILLER, P. J.; DECANINI, E. L.; AFONSO, C. L. Newcastle Disease: evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. **Infection, Genetics and Evolution**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 26–35, 2010. ISSN: 15671348. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.09.012>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19800028/>.

MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. *In*: MEUTEN, D. J. (org.). **Tumors in Domestic Animals**. 4. ed., Iowa: Iowa State Press, 2002. p. 575–606. ISBN: 9780470376928. DOI: <https://doi.org/10.1002/9780470376928>.

MISDORP, W.; ELSE, R.; HELLMÉN, E. **Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat**. 2. ed., Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology and the World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology, 1999. 1–59 p.

MOLOUKI, A.; PEETERS, B. Rescue of recombinant Newcastle disease virus: current cloning strategies and RNA polymerase provision systems. **Archives of Virology**, [s. l.], v. 162, p. 1–12, 2017. ISSN: 03048608. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00705-016-3065-7>.

MONTOYA, M. *et al.* Life expectancy tables for dogs and cats derived from clinical data. **Frontiers in veterinary science**, [s. l.], v. 10, 2023. ISSN: 2297-1769. DOI: <https://doi.org/10.3389/FVETS.2023.1082102>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36896289/>. Acesso em: 4 fev. 2025.

MORRIS, J. S.; DOBSON, J. M.; BOSTOCK, D. E. Use of tamoxifen in the control of canine mammary neoplasia. **The Veterinary record**, [s. l.], v. 133, n. 22, p. 539–542, 1993. ISSN: 0042-4900. DOI: <https://doi.org/10.1136/VR.133.22.539>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8116156/>. Acesso em: 13 jan. 2025.

MORRISON, T. G. Structure and function of a paramyxovirus fusion protein. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, [s. l.], v. 1614, n. 1, p. 73–84, 2003. ISSN: 00052736. DOI: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(03\)00164-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0005-2736(03)00164-0). Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273603001640>.

MPEKRIS, F. *et al.* Normalizing tumor microenvironment with nanomedicine and metronomic therapy to improve immunotherapy. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 345, p. 190, 2022. ISSN: 18734995. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2022.03.008>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9168447/>. Acesso em: 13 jan. 2025.

MUSTAFA, Z. *et al.* Viability reduction and Rac1 gene downregulation of heterogeneous ex-vivo glioma acute slice infected by the oncolytic Newcastle Disease virus strain V4UPM. **BioMed Research International**, [s. l.], p. 1–8, 2013. ISSN: 2314-6133. DOI: <https://doi.org/10.1155/2013/248507>. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/248507/>.

NCI. **FDA approves T-VEC to treat metastatic melanoma - National Cancer Institute**. 2015. Disponível em: <https://www.cancer.gov/news-events/cancer-currents-blog/2015/t-vec-melanoma>.

NEJAD, A. S. M. *et al.* Oncolytic effects of Hitchner B1 strain of Newcastle Disease virus against cervical cancer cell proliferation is mediated by the increased expression of cytochrome C, autophagy and apoptotic pathways. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 147, p. 104438, 2020. ISSN: 08824010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104438>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401020308044>.

NELSON, N. J. Scientific interest in Newcastle Disease virus is reviving. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, [s. l.], v. 91, n. 20, p. 1708–1710, 1999. ISSN: 0027-8874. DOI: <https://doi.org/10.1093/jnci/91.20.1708>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/91.20.1708>.

NELSON, B. H. The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes. **Immunological Reviews**, [s. l.], v. 222, n. 1, p. 101–116, 2008. ISSN: 0105-2896. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00614.x>. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-065X.2008.00614.x>.

NIU, Z. *et al.* Recombinant newcastle disease virus expressing il15 demonstrates promising antitumor efficiency in melanoma model. **Technology in Cancer Research & Treatment**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 607–615, 2015. ISSN: 1533-0346. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.7785/tcrt.2012.500414>. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.7785/tcrt.2012.500414>.

NOSALOVA, N. *et al.* Canine Mammary Tumors: Classification, Biomarkers, Traditional and Personalized Therapies. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 25, n. 5, p. 2891, 2024. ISSN: 14220067. DOI: <https://doi.org/10.3390/IJMS25052891>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10931591/>. Acesso em: 12 jan. 2025.

NOVOSAD, C. A. Principles of treatment for mammary gland tumors. **Clinical techniques in small animal practice**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 107–109, 2003. ISSN: 1096-2867. DOI: <https://doi.org/10.1053/SVMS.2003.36625>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12831071/>. Acesso em: 13 jan. 2025.

NPS. **Talimogene laherparepvec**. 2017. ISSN: 03128008. DOI: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.18773/austprescr.2016.094>. Disponível em: <https://www.nps.org.au/australian-prescriber/articles/talimogene-laherparepvec>.

OCKERT, D. *et al.* **Newcastle disease virus-infected intact autologous tumor cell vaccine for adjuvant active specific immunotherapy of resected colorectal carcinoma - PubMed**. 1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9816085/>. Acesso em: 12 jan. 2025.

OIE. Newcastle disease. *In*: **OIE Terrestrial Manual. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees)**. 7. ed., Paris, France: Biological Standards Commission, World Organization for Animal Health, 2012. v. 1. p. 555–574. ISBN: 9789290448785. Disponível em: www.oie.int.

OLIVEIRA, M. R. *et al.* Hematological and biochemical alterations in female dogs with mammary cancer and inflammatory carcinoma. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [s. l.], v. 74, n. 3, p. 428–436, 2022. ISSN: 0102-0935. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-12471>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/HtFLQpkBqbd3PwS9wwxrmbT/>. Acesso em: 24 abr. 2025.

OSALI, A. *et al.* Multidirectional strategies for targeted delivery of oncolytic viruses by tumor infiltrating immune cells. **Pharmacological Research**, [s. l.], v. 161, 2020. ISSN: 10436618. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105094>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S104366182031402X>.

OTHMAN, F. *et al.* Oncolytic effect of Newcastle Disease virus AF2240 strain on the MCF-7 breast cancer cell line. **Yakhteh**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 17–24, 2010. ISSN: 15614921. Disponível em: <https://celljournal.org/library/upload/article/3 Othman.pdf>.

OWEN, L. N.; UNIT, W. H. Organization. V. P. H.; ONCOLOGY, W. C. C. for C. TNM Classification of Tumours in Domestic Animals/ edited by L.N. Owen. [s. l.], 1980. Disponível em: <https://iris.who.int/handle/10665/68618>. Acesso em: 13 jan. 2025.

PANDA, A. *et al.* Role of fusion protein cleavage site in the virulence of Newcastle Disease virus. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 1–10, 2004. ISSN: 08824010. DOI: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2003.07.003>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7125746/>.

PAOLONI, M.; KHANNA, C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. **Nature reviews. Cancer**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 147–156, 2008. ISSN: 1474-1768. DOI: <https://doi.org/10.1038/NRC2273>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18202698/>. Acesso em: 4 fev. 2025.

PAPAZOGLU, L. Current Surgical Options for Mammary Tumor Removal in Dogs. **Journal of Veterinary Science & Medicine**, [s. l.], v. 1, n. 1, 2012. ISSN: [ISSN: 2325-4645]. DOI: <https://doi.org/10.13188/2325-4645.1000007>. Disponível em: <https://www.avensonline.org/fulltextarticles/JVSM-2325-4645-02-0007.html>. Acesso em: 4 fev. 2025.

PAPPARELLA, S. *et al.* Reproducibility and Feasibility of Classification and National Guidelines for Histological Diagnosis of Canine Mammary Gland Tumours: A Multi-Institutional Ring Study. **Veterinary Sciences**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 357, 2022. ISSN:

23067381. DOI: <https://doi.org/10.3390/VETSCI9070357/S1>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9325225/>. Acesso em: 12 jan. 2025.

PARK, M.-S. *et al.* Newcastle Disease virus V Protein is a determinant of host range restriction. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 77, n. 17, p. 9522–9532, 2003. ISSN: 0022-538X. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/JVI.77.17.9522-9532.2003>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12915566/>.

PATHAK, U.; PAL, R. B.; MALIK, N. The Viral Knock: Ameliorating Cancer Treatment with Oncolytic Newcastle Disease Virus. **Life**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 1626, 2023. ISSN: 20751729. DOI: <https://doi.org/10.3390/LIFE13081626>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10455894/>. Acesso em: 7 jan. 2025.

PATIL, S. S. *et al.* Oncolytic virotherapy in veterinary medicine: current status and future prospects for canine patients. **Journal of translational medicine**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2012. ISSN: 1479-5876. DOI: <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-3>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22216938/>. Acesso em: 17 fev. 2025.

PECORA, A. L. *et al.* Phase I trial of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, in patients with advanced solid cancers. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 20, n. 9, p. 2251–2266, 2002. ISSN: 0732-183X. DOI: <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.08.042>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11980996/>. Acesso em: 9 jan. 2025.

PEEPLER, M. E.; BRATT, M. A. Mutation in the matrix protein of Newcastle Disease virus can result in decreased fusion glycoprotein incorporation into particles and decreased infectivity. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 81–90, 1984. ISSN: 0022-538X. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.51.1.81-90.1984>. Disponível em: <https://jvi.asm.org/content/51/1/81>.

PEETERS, B. P. H. *et al.* Rescue of Newcastle Disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 73, n. 6, p. 5001–5009, 1999. ISSN: 0022-538X. DOI:

<https://doi.org/https://doi.org/10.1128/JVI.73.6.5001-5009.1999>. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC112544/>.

PELNER, L.; FOWLER, G. A.; NAUTS, H. C. Effects of concurrent infections and their toxins on the course of leukemia. **Acta medica Scandinavica. Supplementum**, [s. l.], v. 162, n. 338, p. 5–24, 1958. ISSN: 0365463X. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.0954-6820.1958.tb17327.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.0954-6820.1958.tb17327.x>.

PRADO, M. C. M. *et al.* Investigation of the Prognostic Significance of Vasculogenic Mimicry and Its Inhibition by Sorafenib in Canine Mammary Gland Tumors. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 9, p. 1445, 2019. ISSN: 2234943X. DOI: <https://doi.org/10.3389/FONC.2019.01445>. Disponível em:
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6930929/>. Acesso em: 14 jan. 2025.

RAGHUNATH, S. *et al.* Genetically engineered oncolytic Newcastle Disease virus mediates cytolysis of prostate cancer stem like cells. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 260, p. 91–97, 2017. ISSN: 01681656. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.09.015>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165617316553>.

RAIHAN, J. *et al.* Regression of solid breast tumours in mice by Newcastle Disease virus is associated with production of apoptosis related-cytokines. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 19, n. 1, 2019. ISSN: 1471-2407. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5516-5>. Disponível em:
<https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-019-5516-5>.

RAJMANI, R. S. *et al.* Oncolytic effect of Newcastle disease virus via immune response in dog mammary tumor xenograft in mice. In: XX NATIONAL CONFERENCE ON MANAGING EMERGING AND RE-EMERGING PLANT, ANIMAL, HUMAN AND AQUATIC VIRAL DISEASES: ONE HEALTH PERSPECTIVE HELD AT NATIONAL RESEARCH CENTRE 2011, **Anais [...]**. [S. l.: s. n.], Disponível em:
https://www.researchgate.net/publication/273000647_Oncolytic_effect_of_Newcastle_disease_virus_via_immune_response_in_dog_mammary_tumor_xenograft_in_mice.

RAMAN, S. S.; HECHT, J. R.; CHAN, E. Talimogene laherparepvec: review of its mechanism of action and clinical efficacy and safety. **Immunotherapy**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 705–723, 2019. ISSN: 1750-7448. DOI: <https://doi.org/10.2217/IMT-2019-0033>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31045464/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

RESTIFO, N. P.; SMYTH, M. J.; SNYDER, A. Acquired resistance to immunotherapy and future challenges. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 121–126, 2016. ISSN: 1474-175X. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nrc.2016.2>. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrc.2016.2>.

RÖMER-OBERDÖRFER, A. *et al.* Contribution of the length of the HN protein and the sequence of the F protein cleavage site to Newcastle disease virus pathogenicity. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 84, n. 11, p. 3121–3129, 2003. ISSN: 0022-1317. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/vir.0.19416-0>. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.19416-0>.

ROSSMEISL, J. H. *et al.* INVITED REVIEW – NEUROIMAGING RESPONSE ASSESSMENT CRITERIA FOR BRAIN TUMORS IN VETERINARY PATIENTS. **Veterinary radiology & ultrasound : the official journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association**, [s. l.], v. 55, n. 2, p. 115, 2013. ISSN: 10588183. DOI: <https://doi.org/10.1111/VRU.12118>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3949168/>. Acesso em: 4 fev. 2025.

ROSSMEISL, J. H. *et al.* Phase I/II Trial of Urokinase Plasminogen Activator-Targeted Oncolytic Newcastle Disease Virus for Canine Intracranial Tumors. **Cancers**, [s. l.], v. 16, n. 3, 2024. ISSN: 2072-6694. DOI: <https://doi.org/10.3390/CANCERS16030564>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38339315/>. Acesso em: 16 jan. 2025.

SAMAL, S. *et al.* A single amino acid change, Q114R, in the cleavage-site sequence of Newcastle Disease virus fusion protein attenuates viral replication and pathogenicity. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 92, n. 10, p. 2333–2338, 2011. ISSN: 00221317. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/vir.0.033399-0>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21677091/>.

SANCHEZ., D. *et al.* In Vitro and in Vivo oncolytic activity of LaSota strain of Newcastle Disease Virus on a lymphoma B-Cell line and a canine cutaneous T-cell lymphoma. **Blood**, [s. l.], v. 124, n. 21, p. 5504, 2014. ISSN: 0006-4971. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1182/blood.V124.21.5504.5504>.

SÁNCHEZ, D. *et al.* Newcastle Disease virus: potential therapeutic application for human and canine lymphoma. **Viruses**, [s. l.], v. 8, n. 1, 2016. ISSN: 1999-4915. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/v8010003>. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1999-4915/8/1/3>.

SÁNCHEZ, D. *et al.* Oncolytic viruses for canine cancer treatment. **Cancers**, [s. l.], v. 10, n. 11, 2018. ISSN: 20726694. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/cancers10110404>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30373251/>.

SÁNCHEZ, D. *et al.* The NDV-MLS as an Immunotherapeutic Strategy for Breast Cancer: Proof of Concept in Female Companion Dogs with Spontaneous Mammary Cancer. **Viruses**, [s. l.], v. 16, n. 3, 2024. ISSN: 1999-4915. DOI: <https://doi.org/10.3390/V16030372>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38543739/>. Acesso em: 16 jan. 2025.

SANTOS, M. R. *et al.* Oncolytic effect of Newcastle disease virus is attributed to interferon regulation in canine mammary cancer cell lines. **Veterinary and Comparative Oncology**, [s. l.], p. 1–9, 2021. ISSN: 1476-5829. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/vco.12699>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/vco.12699>.

SCHIRRMACHER, V. Antitumor immune memory and its activation for control of residual tumor cells and improvement of patient survival: A new concept derived from translational research with the virusmodified tumor vaccine ATV-NDV. **Viral Therapy of Human Cancers**, [s. l.], p. 481–532, 2004. ISBN: 9781420030402. DOI: <https://doi.org/10.1201/B14180-7/ANTITUMOR-IMMUNE-MEMORY-ACTIVATION-CONTROL-RESIDUAL-TUMOR-CELLS-IMPROVEMENT-PATIENT-SURVIVAL-NEW-CONCEPT-DERIVED-TRANSLATIONAL-RESEARCH-VIRUS-MODIFIED-TUMOR-VACCINE-ATV-NDV-VOLKER-SCHIRRMACHER>. Disponível em: <https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/b14180-7/antitumor-immune-memory-activation-control-residual-tumor-cells-improvement-patient-survival-new-concept-derived->

translational-research-virus-modified-tumor-vaccine-atv-ndv-volker-schirmacher. Acesso em: 12 jan. 2025.

SCHIRRMACHER, V. Immunobiology of Newcastle Disease virus and its use for prophylactic vaccination in poultry and as adjuvant for therapeutic vaccination in cancer patients. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 18, n. 5, 2017. ISSN: 1422-0067. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms18051103>. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1422-0067/18/5/1103>.

SCHIRRMACHER, V. *et al.* Long-term survival of a breast cancer patient with extensive liver metastases upon immune and virotherapy: a case report. **Immunotherapy**, [s. l.], v. 7, n. 8, p. 855–860, 2015. ISSN: 1750-7448. DOI: <https://doi.org/10.2217/IMT.15.48>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26020523/>. Acesso em: 9 jan. 2025.

SCHIRRMACHER, V. *et al.* Newcastle Disease virus activates macrophages for anti-tumor activity. **Journal of Oncology**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 363–273, 2000. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.3892/ijo.16.2.363>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10639582/>.

SCHIRRMACHER, V. Oncolytic Newcastle disease virus as a prospective anti-cancer therapy. A biologic agent with potential to break therapy resistance. **Expert opinion on biological therapy**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. 1757–1771, 2015. ISSN: 1744-7682. DOI: <https://doi.org/10.1517/14712598.2015.1088000>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26436571/>.

SCHIRRMACHER, V.; FOURNIER, P. Newcastle Disease virus: a promising vector for viral therapy, immune therapy, and gene therapy of cancer. In: **Methods in Molecular Biology**. [S. l.: s. n.], . v. 542. p. 565–605. ISSN: 10643745. DOI: https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-59745-561-9_30. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-561-9_30.

SCHIRRMACHER, V.; VAN GOOL, S.; STUECKER, W. Breaking therapy resistance: an update on oncolytic Newcastle Disease virus for improvements of cancer therapy. **Biomedicines**, [s. l.], v. 7, n. 3, 2019. ISSN: 22279059. DOI:

<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/biomedicines7030066>. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31480379/>.

SCHULZE, T. *et al.* Efficiency of adjuvant active specific immunization with Newcastle disease virus modified tumor cells in colorectal cancer patients following resection of liver metastases: Results of a prospective randomized trial. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, [s. l.], v. 58, n. 1, p. 61–69, 2009. ISSN: 03407004. DOI: <https://doi.org/10.1007/S00262-008-0526-1>. Acesso em: 12 jan. 2025.

SEGEV, G. **Serum Creatinine Concentration: Useful Tips for Correct Interpretation World Small Animal Veterinary Association Congress Proceedings**. 2018. Disponível em: <https://www.vin.com/apputil/content/defaultadv1.aspx?pId=22915&catId=124658&id=8896680>. Acesso em: 7 fev. 2025.

SEMIGLAZOV, V. *et al.* Immunology and immunotherapy in breast cancer. **Cancer Biology & Medicine**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 609, 2022. ISSN: 20953941. DOI: <https://doi.org/10.20892/J.ISSN.2095-3941.2021.0597>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9196061/>. Acesso em: 12 jan. 2025.

SERRANO-DEL VALLE, A. *et al.* Immunogenic cell death and immunotherapy of multiple myeloma. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 7, 2019. ISSN: 2296-634X. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00050>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2019.00050/full>.

SHAN, P. *et al.* NDV-D90 inhibits 17 β -estradiol-mediated resistance to apoptosis by differentially modulating classic and nonclassic estrogen receptors in breast cancer cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 122, n. 1, p. 3–15, 2021. ISSN: 1097-4644. DOI: <https://doi.org/10.1002/JCB.28118>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcb.28118>. Acesso em: 9 jan. 2025.

SHAO, X. *et al.* STAT3 contributes to oncolytic Newcastle Disease virus-induced immunogenic cell death in melanoma cells. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 9, 2019. ISSN: 2234-943X. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00436>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2019.00436/full>.

SIDDIQUI, F. *et al.* A phase I trial of hyperthermia-induced interleukin-12 gene therapy in spontaneously arising feline soft tissue sarcomas. **Molecular cancer therapeutics**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 380–391, 2007. ISSN: 1535-7163. DOI: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0342>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17237297/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

SILVA SOARES, E. *et al.* Prognostic Factors for Cancer-Specific Survival and Disease-Free Interval of Dogs with Mammary Carcinomas. **Veterinary Medicine International**, [s. l.], v. 2023, n. 1, p. 6890707, 2023. ISSN: 2042-0048. DOI: <https://doi.org/10.1155/2023/6890707>. Disponível em: </doi/pdf/10.1155/2023/6890707>. Acesso em: 24 abr. 2025.

SINKOVICS, J. Studies on the biological characteristics of the newcastle disease virus (NDV) adapted to the brain of newborn mice. **Archiv for die gesamte Virusforschung**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 403–411, 1957. ISSN: 0304-8608. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF01240748>. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/BF01240748>.

SINKOVICS, J. G.; HORVATH, J. C. Newcastle disease virus (NDV): brief history of its oncolytic strains. **Journal of Clinical Virology**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 1–15, 2000. ISSN: 13866532. DOI: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1386-6532\(99\)00072-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1386-6532(99)00072-4). Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386653299000724>.

SMITH, B. F. *et al.* Administration of a conditionally replicative oncolytic canine adenovirus in normal dogs. **Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 601–606, 2006. ISSN: 1084-9785. DOI: <https://doi.org/10.1089/CBR.2006.21.601>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17257075/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

SONG, H. *et al.* Application of Newcastle disease virus in the treatment of colorectal cancer. **World Journal of Clinical Cases**, [s. l.], v. 7, n. 16, p. 2143–2154, 2019. ISSN: 2307-8960. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.12998/wjcc.v7.i16.2143>. Disponível em: <https://www.wjgnet.com/2307-8960/full/v7/i16/2143.htm>.

SORENMO, K. U. *et al.* Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. **Veterinary pathology**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 85–97, 2011. ISSN: 1544-2217. DOI: <https://doi.org/10.1177/0300985810389480>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21147765/>. Acesso em: 9 jan. 2025.

SORENMO, K. U.; DEANNA, R. W.; GOLDSMIDT, R. H. Tumors of the mammary gland. *In*: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. (org.). **Withrow and Macewen's Small Animal Clinical Oncology**. 5. ed., Philadelphia: Saunders, 2013. p. 553–571. ISBN: 9781437723632.

SOUZA, C. H. *et al.* Inflammatory mammary carcinoma in 12 dogs: Clinical features, cyclooxygenase-2 expression, and response to piroxicam treatment. **The Canadian Veterinary Journal**, [s. l.], v. 50, n. 5, p. 506, 2009. ISSN: 00085286. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2671873/>. Acesso em: 13 jan. 2025.

SPUGNINI, E. P.; BALDI, A. Electrochemotherapy in Veterinary Oncology: State-of-the-Art and Perspectives. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, [s. l.], v. 49, n. 5, p. 967–979, 2019. ISSN: 1878-1306. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.CVSM.2019.04.006>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31176458/>. Acesso em: 19 fev. 2025.

SUGAWARA, K. *et al.* Oncolytic herpes virus G47 Δ works synergistically with CTLA-4 inhibition via dynamic intratumoral immune modulation. **Molecular therapy oncolytics**, [s. l.], v. 22, p. 129–142, 2021. ISSN: 2372-7705. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.OMTO.2021.05.004>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34514094/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

SUN, C. *et al.* Roles of the highly conserved amino acids in the globular head and stalk region of the Newcastle Disease virus HN protein in the membrane fusion process. **BioScience Trends**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 56–64, 2015. ISSN: 18817823. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.5582/bst.2014.01140>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25787910/>.

SUTER, S. E. *et al.* In vitro canine distemper virus infection of canine lymphoid cells: a prelude to oncolytic therapy for lymphoma. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 1579–1587, 2005. ISSN: 1078-0432. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1944>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15746063/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

SWAMINATHAN, A. **Effect of Newcastle disease virus AF2240 on allografted 4T1 breast cancer cells in balb / c mice**. 2010. 15 f. Degree os Masters of Science - Universiti Putra Malaysia, [s. l.], 2010. Disponível em: <https://core.ac.uk/reader/153804230>.

SZALAY, A. A. *et al.* Significant Growth Inhibition of Canine Mammary Carcinoma Xenografts following Treatment with Oncolytic Vaccinia Virus GLV-1h68. **Journal of oncology**, [s. l.], v. 2010, 2010. ISSN: 1687-8469. DOI: <https://doi.org/10.1155/2010/736907>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20631910/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, [s. l.], v. 140, n. 6, p. 805–820, 2010. ISSN: 00928674. DOI: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20303872/>.

TAN, L. *et al.* Newcastle disease virus employs macropinocytosis and Rab5a-dependent intracellular trafficking to infect DF-1 cells. **Oncotarget**, [s. l.], v. 7, n. 52, p. 86117, 2016. ISSN: 19492553. DOI: <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.13345>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5349901/>. Acesso em: 12 jan. 2025.

TAP, W. D. *et al.* Olaratumab and doxorubicin versus doxorubicin alone for treatment of soft-tissue sarcoma: an open-label phase 1b and randomised phase 2 trial. **The Lancet**, [s. l.], v. 388, n. 10043, p. 488–497, 2016. ISSN: 01406736. DOI: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30587-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30587-6). Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673616305876>.

TAYEB, S.; ZAKAY-RONES, Z.; PANET, A. Therapeutic potential of oncolytic Newcastle Disease virus a critical review. **Oncolytic Virotherapy**, [s. l.], v. 4, p. 49–62, 2015. ISSN: 2253-1572. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.2147/OV.S78600>. Disponível em:

<http://www.dovepress.com/therapeutic-potential-of-oncolytic-newcastle-disease-virus-a-critical-peer-reviewed-article-OV>.

TENG, M. W. L. *et al.* Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. **Journal of Leukocyte Biology**, [s. l.], v. 84, n. 4, p. 988–993, 2008. ISSN: 07415400. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1189/jlb.1107774>. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1189/jlb.1107774>.

TERNOVOI, V. V. *et al.* Productive replication of human adenovirus type 5 in canine cells. **Journal of virology**, [s. l.], v. 79, n. 2, p. 1308–1311, 2005. ISSN: 0022-538X. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.79.2.1308-1311.2005>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15613357/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

THRALL, M. A. *et al.* **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2. ed., São Paulo: Roca, 2015.

TOLOSA, E. M. C. De *et al.* Manual de técnicas para histologia: normal e patológica. [s. l.], p. 331, 2003. ISBN: 85-204-1440-0. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/001465062>. Acesso em: 1 fev. 2025.

UL-RAHMAN, A. *et al.* **Zoonotic potential of Newcastle disease virus: Old and novel perspectives related to public health. Reviews in Medical Virology** John Wiley and Sons Ltd, 2022. (1) ISSN: 10991654. DOI: <https://doi.org/10.1002/rmv.2246>.

URBASIC, A. S. *et al.* Oncolysis of canine tumor cells by myxoma virus lacking the *serp2* gene. **American journal of veterinary research**, [s. l.], v. 73, n. 8, p. 1252–1261, 2012. ISSN: 1943-5681. DOI: <https://doi.org/10.2460/AJVR.73.8.1252>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22849686/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

VAFAEI, R. *et al.* Comparison of mucin-1 in human breast cancer and canine mammary gland tumor: a review study. **Cancer Cell International**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 14, 2022. ISSN: 14752867. DOI: <https://doi.org/10.1186/S12935-021-02398-6>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8744232/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

VAJDIC, C. M.; VAN LEEUWEN, M. T. Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. **International Journal of Cancer**, [s. l.], v. 125, n. 8, p. 1747–1754, 2009.

ISSN: 00207136. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ijc.24439>. Disponível em:

<http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.24439>.

VIJAYAKUMAR, G.; PALESE, P.; GOFF, P. H. Oncolytic Newcastle Disease virus expressing a checkpoint inhibitor as a radioenhancing agent for murine melanoma.

EBioMedicine, [s. l.], v. 49, p. 96–105, 2019. ISSN: 23523964. DOI:

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.10.032>. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352396419307029>.

VILLAR, E.; BARROSO, I. M. Role of sialic acid-containing molecules in paramyxovirus entry into the host cell: a minireview. **Glycoconjugate Journal**, [s. l.], v. 23, n. 1–2, p. 5–17, 2006. ISSN: 02820080. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10719-006-5433-0>.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16575518/>.

WANG, Y. *et al.* Two mutations in the HR2 region of Newcastle Disease virus fusion protein with a cleavage motif “RRQRRL” are critical for fusogenic activity. **Virology Journal**, [s. l.], v. 14, n. 1, 2017. ISSN: 1743-422X. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s12985-017-0851-0>. Disponível em: <http://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12985-017-0851-0>.

WANG, S. L.; LEE, J. J.; LIAO, A. T. Comparison of efficacy and toxicity of doxorubicin and mitoxantrone in combination chemotherapy for canine lymphoma. **The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne**, [s. l.], v. 57, n. 3, p. 271–276, 2016. ISSN: 00085286. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26933263/>.

WANG, J.; LI, Mengqing; LI, Meng. Newcastle disease virus LaSota strain induces apoptosis and activates the TNF α /NF- κ B pathway in canine mammary carcinoma cells. **Veterinary and Comparative Oncology**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 520–532, 2023. ISSN: 1476-5829. DOI: <https://doi.org/10.1111/VCO.12915>. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/vco.12915>. Acesso em: 16 jan. 2025.

WARBURG, O. On the origin of cancer cells. **Science**, [s. l.], v. 123, n. 3191, p. 309–314, 1956. ISSN: 0036-8075. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>. Disponível em: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.123.3191.309>.

WARBURG, O. H. The Metabolism of Tumours: Investigations from the Kaiser Wilhelm Institute for Biology, Berlin-Dahlem. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, [s. l.], v. 96, n. 23, 1931. ISSN: 0098-7484. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.1931.02720490062043>.

WASHBURN, B. *et al.* TNF-related apoptosis-inducing ligand mediates tumoricidal activity of human monocytes stimulated by Newcastle disease virus. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [s. l.], v. 170, n. 4, p. 1814–1821, 2003. ISSN: 0022-1767. DOI: <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.170.4.1814>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12574346/>. Acesso em: 10 jan. 2025.

WEI, D. *et al.* Fighting Cancer with Viruses: Oncolytic Virus Therapy in China. **Human gene therapy**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 151–159, 2018. ISSN: 1557-7422. DOI: <https://doi.org/10.1089/HUM.2017.212>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29284308/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

WELCH, B. D. *et al.* Probing the functions of the paramyxovirus glycoproteins F and HN with a panel of synthetic antibodies. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 88, n. 20, p. 11713–11725, 2014. ISSN: 0022-538X. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.01707-14>. Disponível em: <https://jvi.asm.org/content/88/20/11713>.

WESTBERG, S. *et al.* Treatment efficacy and immune stimulation by AdCD40L gene therapy of spontaneous canine malignant melanoma. **Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)**, [s. l.], v. 36, n. 6, p. 350–358, 2013. ISSN: 1537-4513. DOI: <https://doi.org/10.1097/CJI.0B013E31829D8A1B>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23799414/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

WHEELOCK, E. F.; DINGLE, J. H. Observations on the repeated administration of viruses to a patient with acute leukemia - a preliminary report. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 271, n. 13, p. 645–651, 1964. ISSN: 0028-4793. DOI:

<https://doi.org/https://doi.org/10.1056/NEJM196409242711302>. Disponível em:
<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM196409242711302>.

WILLIAMS, C. B.; YEH, E. S.; SOLOFF, A. C. Tumor-associated macrophages: unwitting accomplices in breast cancer malignancy. **NPJ Breast Cancer**, [s. l.], v. 2, n. 1, 2016. ISSN: 2374-4677. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/npjbcancer.2015.25>. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/npjbcancer201525>.

WU, Y. *et al.* Recombinant Newcastle Disease virus expressing human TRAIL as a potential candidate for hepatoma therapy. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 802, p. 85–92, 2017. ISSN: 18790712. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.02.042>.

YAACOV, B. *et al.* Selective oncolytic effect of an attenuated Newcastle Disease virus (NDV-HUJ) in lung tumors. **Cancer Gene Therapy**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. 795–807, 2008. ISSN: 0929-1903. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/cgt.2008.31>. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/cgt200831>.

YANG, H. *et al.* The Application of Newcastle Disease Virus (NDV): Vaccine Vectors and Tumor Therapy. **Viruses**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 886, 2024. ISSN: 19994915. DOI: <https://doi.org/10.3390/V16060886>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11209082/>. Acesso em: 8 jan. 2025.

YE, T. *et al.* Oncolytic Newcastle disease virus induces autophagy-dependent immunogenic cell death in lung cancer cells. **American journal of cancer research**, [s. l.], v. 8, n. 8, p. 1514–1527, 2018. ISSN: 2156-6976. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6129498/>.

YURCHENKO, K. S. *et al.* Oncolytic effect of wild-type Newcastle disease virus isolates in cancer cell lines in vitro and in vivo on xenograft model. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 13, n. 4, 2018. ISSN: 1932-6203. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195425>. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0195425>.

ZAMARIN, D. *et al.* Localized Oncolytic Virotherapy Overcomes Systemic Tumor Resistance to Immune Checkpoint Blockade Immunotherapy. **Science Translational**

Medicine, [s. l.], v. 6, n. 226, p. 226–232, 2014. ISSN: 1946-6234. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008095>. Disponível em: <https://stm.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/scitranslmed.3008095>.

ZAMARIN, D.; PALESE, P. Oncolytic Newcastle Disease Virus for cancer therapy: old challenges and new directions. **Future microbiology**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 347, 2012. ISSN: 17460913. DOI: <https://doi.org/10.2217/FMB.12.4>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4241685/>. Acesso em: 7 jan. 2025.

ZAMARIN, D.; WOLCHOK, J. D. Potentiation of immunomodulatory antibody therapy with oncolytic viruses for treatment of cancer. **Molecular Therapy - Oncolytics**, [s. l.], v. 1, 2014. ISSN: 23727705. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/mto.2014.4>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2372770516300262>.

ZAPPULLI, V. *et al.* Mammary tumors. In: **Surgical Pathology of Tumors of Domestic Animals**. Washington: Davis-Thompson DVM Foundation, 2018. v. 2. p. 1–195.

ZENG, J.; FOURNIER, P.; SCHIRRMACHER, V. Induction of Interferon- α and Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand in Human Blood Mononuclear Cells by Hemagglutinin-Neuraminidase but Not F Protein of Newcastle Disease Virus. **Virology**, [s. l.], v. 297, n. 1, p. 19–30, 2002. ISSN: 00426822. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/viro.2002.1413>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682202914133>.

ZHAN, Y. *et al.* Newcastle Disease virus infection activates PI3K/Akt/mTOR and p38 MAPK/Mnk1 pathways to benefit viral mRNA translation via interaction of the viral NP protein and host eIF4E. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. e1008610, 2020. ISSN: 15537374. ISBN: 1111111111. DOI: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1008610>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7326156/>. Acesso em: 8 jan. 2025.

ZHAO, H. *et al.* Recombinant Newcastle Disease virus expressing human interleukin-2 serves as a potential candidate for tumor therapy. **Virus Research**, [s. l.], v. 136, n. 1–2, p. 75–80, 2008. ISSN: 01681702. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.04.020>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016817020800169X>.

ZULKIFLI, M. M. *et al.* Newcastle diseases virus strain V4UPM displayed oncolytic ability against experimental human malignant glioma. **Neurological Research**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 3–10, 2009. ISSN: 0161-6412. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1179/174313208x325218>. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/174313208X325218>.

CAPÍTULO II – Evaluation of effect of Newcastle disease virus (La Sota strain) in human prostate tumor cell line using the chicken embryo model

Artigo submetido ao periódico

Laboratory Animals

Evaluation of effect of Newcastle disease virus (La Sota strain) in prostate tumor cell line using the chicken embryo model

Arlinda F. Coletto¹; Belchiolina B. Fonseca²; Letícia S. Pimentel²; Simone Sommerfeld³; Paula F. de Sousa Braga³; Danilo C. Moreira⁴; Emília R. Vaz²; Vivian Alonso-Goulart²; Alessandra A. Medeiros-Ronchi⁵

¹Animal Pathology Laboratory, Graduate Program in Veterinary Sciences, Federal University of Uberlândia, Brazil. Corresponding Author: arlindacoletto@hotmail.com

²Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlândia, Brazil.

³Avian Incubation Laboratory, Federal University of Uberlândia, Brazil.

⁴Nanobiotechnology Laboratory, Graduate Program in Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia, Brazil.

⁵Department of Animal Pathology, Federal University of Uberlândia, Brazil.

Funding

Esta pesquisa foi realizada com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e financiada por Rede Mineira de Pesquisa Translacional em Imunobiológicos e Biofármacos no Câncer (REMITRIBIC, RED-00031-21), Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia (INCT-TeraNano), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq Grant n° 403193/2022-2) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG Grant 01/2021 - DEMANDA UNIVERSAL APQ-02551-21; FAPEMIG Grant PPM n°00758-16 and FAPEMIG Grant n°CBB-APQ-03613-17).

Acknowledgment

The researchers extend their gratitude to the Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEV), Laboratório Nanobiotechnologia Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart (NANOS), Laboratório de Doenças Infectocontagiosas (LADOC) and Laboratório de Incubação de aves (LIAVE), all located in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the research, authorship, or publication of this article.

Abstract

In oncology alternative therapies are under investigation, including oncolytic viruses. The Newcastle disease virus (NDV) stands out due to its capacity to selectively target and destroy tumor cells, as well as its ability to trigger a robust antitumor immune response. This study explored the oncolytic potential of the La Sota strain of the Newcastle disease virus (NDV) in PC-3 human prostate cancer cells using the CAM model. NDV demonstrated a concentration-dependent reduction in cancer cell viability, without significantly affecting normal cell viability. The CAM assay exhibited high embryonic viability and low mortality rates, with NDV inhibiting tumor growth in a dose-dependent manner. Tumor angiogenesis was not impacted by NDV, and the secretion of the cytokine IL-6, associated with tumor growth and resistance, was reduced to levels comparable to untreated controls. La Sota strain induced cytotoxicity in prostate tumor cells and reduced tumor size, despite NDV did not affecting tumor angiogenesis. The therapeutic effects of NDV against prostate tumor cells probably are related to suppression of IL-6 signaling. The CAM assay has been demonstrated for the first time as a safe model for evaluating the antitumor effects of NDV in PC-3 cell xenografts. This work underscores the significant value of CE for testing tumor inhibition through virotherapy.

Keywords: antitumoral effects, embryonated eggs, oncolytic viruses, PC-3 cell lineage.

Introduction

NDV, a Paramyxovirus 1, has well-established antitumor properties, making it potentially useful in cancer treatment¹. Its significant advantage is the ability to selectively induce the lysis of tumor cells while preserving normal cells², demonstrating lower toxicity than chemotherapies³. The La Sota strain of NDV is particularly advantageous compared to other oncolytic viruses (OVs)⁴, as it is a lentogenic vaccine strain, not classified as causing Newcastle disease (ND) by the World Organization for Animal Health (WOAH)⁵. Therefore, it is one of the most widely used strains in vitro and in vivo tests^{6,7} to study anticancer treatments.

Preclinical studies show that NDV selectively kills tumor cells and stimulates an antitumor immune response, both innate and adaptive, inducing immunogenic cell death (ICM) through several pathways^{8,13}.

NDV presents characteristics of an ideal oncolytic virus, proving to be a promising candidate for the treatment of various types of cancers in humans and canines, including mammary neoplasms. Studies highlight the efficiency of NDV in animal tumor models, inducing cell death by apoptosis and reducing cell survival^{14,15}. Further research is needed to evaluate the efficacy of OV in the treatment of neoplasms in animals^{16,17}.

The CE model has been employed to evaluate the effectiveness of anticancer treatments, particularly utilizing the CAM and CAM-induced tumors to study nanotoxicity and drug efficacy¹⁸. Particularly between 10 and 18 EID, during embryonic immunodeficiency¹⁸, the intense vascularization of the CAM facilitates the essential supply of nutrients for angiogenesis and the growth of tumor grafts^{19,20}. Therefore, the CAM assay can be a valuable tool for evaluating the tumor microenvironment, antiangiogenic therapies, and real-time tumor progression²¹.

The CE model is considered a versatile *ex vivo* system for the study of prostate cancers, with encouraging results in the use of anticancer drugs in PC-3 cell xenografts²²⁻²⁶. However, to date, there are no records of studies that have utilized the CAM model to investigate the behavior of Newcastle disease virus (NDV), particularly the La Sota strain, for evaluating embryonic toxicity and analyzing cytotoxicity in PC-3 cell xenografts implanted in the CAM.

Biotechnological advances promise to create safer virus strains for cancer treatment, and in this context, the CAM assay can be an ally. Thus, our objective was to evaluate the oncolytic potential of the La Sota strain of NDV using PC-3 cells and CAM assay as a model.

Material and methods

Cell culture

Human prostate adenocarcinoma (PC-3) and normal human prostate epithelium (PNT-2) cell lines were procured from the American Type Culture Collection (ATCC; Virginia, USA). Both cell lines were thawed (37 °C; water bath; Cientec; Brazil), centrifuged (5 minutes; 1000 RPM; Eppendorf; Germany), and resuspended. They were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium Gibco (Merck KGaA; Germany), supplemented with

10 % fetal bovine serum (FBS) (Cultilab; Brazil) and maintained at 37 °C in 5 % CO₂ (Forma™ Series II Water-Jacketed CO₂ Incubator; Thermo Scientific™; Massachusetts, USA).

The cells were monitored every 48 hours using an inverted digital imaging system EVOS microscope (Thermo Scientific™; Massachusetts, USA) and were trypsinized (5 minutes; 37 °C) for transfer to polystyrene flasks upon reaching confluence. All cell lines were maintained mycoplasma-free and confirmed by PCR.

Newcastle disease virus

Vaccines were sourced from specific pathogen-free (SPF) embryonated eggs (New-Vacin La Sota; Bio-Vet; Brazil). As per the manufacturer's manual, 50 ml contains 10^{6.2} DIE50 (50 % Infectious Dose) of live NDV, La Sota strain. For the *in vitro* cell viability assay detailed in the section '*In vitro cell viability (resazurin-based assay)*,' an initial viral titer of 10^{5.2} DIE50 (10 ml of reconstituted virus) was utilized as treatment 1 (VC1). For subsequent treatments (VC2 to VC7), serial 1:2 dilutions of the virus in phosphate-buffered saline (PBS) were prepared.

To determine the viral concentration in plaque-forming units (PFU), the following formula was used: $PFU/ml = (D/E) \times 1/V$, where D represents the initial viral titer in DIE50 (10^{5.2} DIE50), E denotes the volume unit transferred at each concentration (1 ml), and V signifies the final concentration volume (ml). Given that the experiments were performed with decimal dilutions of the virus, PFU counts were converted to logarithmic values²⁷. The concentration exhibiting the highest cytotoxicity for PC-3 cells and the lowest cytotoxicity for PNT-2 cells was selected for *ex ovo* testing.

The IC₅₀ values (50 % inhibitory concentration) were determined using dose-response sigmoid curves with GraphPad Prism 9 software²⁸ (GraphPad Software; California, USA). The selectivity index (SI) ≥ 2 was considered significant²⁹.

In vitro cell viability (resazurin-based assay)

Both PNT-2 and PC-3 cells were trypsinized and counted using the Trypan Blue exclusion protocol to assess cell viability³⁰. Cytotoxicity was investigated colorimetrically via the biochemical reduction of resazurin, utilizing a highly fluorescent resorufin-based *in vitro* assay kit (Merck KGaA; Germany). A total of 5x10³ cells/well were seeded in 96-well microplates (Greiner Bio-One; North Carolina, USA), cultured in RPMI medium, and incubated for 24 hours at 37 °C in 5 % CO₂ (Forma™ Series II Water-Jacketed CO₂ Incubator; Thermo Scientific™, Massachusetts, USA).

After adhesion, the RPMI medium was replaced with specific treatments based on the group in Control group (C): the cells were incubated in 100 μ L of complete RPMI medium; Treatment 1 group (VC1 = viral concentration 1): the cells were treated with 100 μ L of the La Sota strain of NDV at a concentration of 5.2 log PFU/ml; Treatment 2 group (VC2 = viral concentration 2): the cells were treated with 100 μ L of the La Sota strain of NDV at a concentration of 4.9 log PFU/ml; Treatment 3 group (VC3 = viral concentration 3): the cells were treated with 100 μ L of the La Sota strain of NDV at a concentration of 4.6 log PFU/ml; Treatment 4 group (VC4 = viral concentration 4): the cells were treated with 100 μ L of the La Sota strain of NDV at a concentration of 4.3 log PFU/ml; Treatment 5 group (VC5 = viral concentration 5): the cells were treated with 100 μ L of the La Sota strain of NDV at a concentration of 4.0 log PFU/ml; Treatment 6 group (VC6 = viral concentration 6): the cells were treated with 100 μ L of the La Sota strain of NDV at a concentration of 3.7 log PFU/ml; Treatment 7 group (VC7 = viral concentration 7): the cells were treated with 100 μ L of the La Sota strain of NDV at a concentration of 3.4 log PFU/ml. The control group (C) represented 100 % cell viability.

The cells were incubated for 72 hours at 37 °C in 5 % CO₂ (Forma™ Series II Water-Jacketed CO₂ Incubator; Thermo Scientific™; Massachusetts, USA). During the first 24 hours, cells were incubated with the treatments. Subsequently, the treatments were removed, and cells were incubated with RPMI medium for the last 48 hours. Subsequently, 10 μ L/well of resazurin dye solution was added, and the cultures were re-incubated for 4 hours at 37 °C in 5 % CO₂ (Forma™ Series II Water-Jacketed CO₂ Incubator; Thermo Scientific™; Massachusetts, USA). Absorbance was measured at wavelengths 570-600 nm using a spectrophotometer (PerkinElmer® Massachusetts, USA).

Cell viability was determined in three independent experiments and calculated as a percentage (%) using the formula: cell viability = (absorbance of treated cells / absorbance of untreated cells) $\times$ 100 with GraphPad Prism 9 software²⁸ (GraphPad Software; California, USA).

Chicken embryos

Embryonated white eggs from Hy-Line W-36 commercial laying hens (*Gallus gallus*) were supplied by a national company (Granja Planalto; Brazil). The embryos were kept at 37 °C and 58 % relative humidity in an artificial incubator (60g/m³; Premium Ecológica, Brazil). The eggs were examined under ovoscopy to ensure quality and proper embryonic development before the experiments.

Embryonic toxicity test

For the *ex vivo* toxicity evaluation, a previously described technique was adapted³⁴. Ten non-specific pathogen-free (non-SPF) embryos at 7 EID were used. The eggs were disinfected, and 2x2 cm windows were created in the shell using a mini bench circular saw in a sterile environment (laminar flow) to expose the CAM³⁵. Five embryos were inoculated with 100 µl of the virus at a viral concentration of 4.60 log PFU/ml directly onto the CAM, while another five embryos served as controls and were inoculated with 100 µl of PBS.

Embryo viability was monitored using ovoscopy for ten consecutive days. Embryos at 17 EID were euthanized as recommended^{36,37}. Embryonic viability (% EV) was calculated using the formula: (number of eggs at 7 EID - number of eggs at 17 EID) × 100 / number of eggs at 17 EID.

Tumor inhibition and regression assay in CAM

Forty non-SPF eggs at 7 EID were used. The eggs were disinfected, and 2x2 cm windows were created in the shell using a mini bench circular saw in a sterile environment (laminar flow) to expose the CAM³⁵.

The groups were divided according to the treatment in Control group (NC = negative control): 100 µl of PBS/egg were inoculated onto the CAM of ten eggs; Untreated group (PC = positive control): 10⁶ cells/egg diluted in 80 µl of complete RPMI medium + 20 µl of Matrigel/egg were inoculated onto the CAM of ten eggs; Treatment 1 group (PID = post-infected for 4 days): 10⁶ cells/egg diluted in 80 µl of complete RPMI medium/egg + 20 µl of Matrigel/egg were inoculated onto the CAM of ten eggs. From EID 11 to EID 14, the xenografts were topically treated with 100 µl of the La Sota strain of NDV at a concentration of 4.60 log PFU/ml/egg; Treatment 2 Group (PIH = pre-infected for 4 hours): 10⁶ cells/egg diluted in 25 µl of complete RPMI medium/egg were treated with 80 µl of the La Sota strain of NDV at a concentration of 4.60 PFU/ml/egg, incubated for 4 hours in an incubator at 37°C, mixed with 20 µl of Matrigel/egg, and subsequently inoculated onto the CAM of ten eggs.

After treatments on the CAM, the shell windows were covered with plastic film. The embryos were kept at 37 °C and 58 % relative humidity in an artificial incubator (60g/m³; Premium Ecológica, Brazil).

Embryo viability and mortality were recorded daily. At 15 EID, delicate incisions were made at the level of the CAM using iris straight scissors, and the embryos were euthanized as recommended^{36,37}. The % EV was calculated using the formula: (number of eggs at 7 EID - number of eggs at 15 EID) × 100 / number of eggs at 15 EID.

The CAM was exposed, and images of all eggs were captured (12 MP; 3024 x 4032 px; rear camera of Apple iPhone 7, 28 mm f/1.8 lens). Samples from all groups were collected. The sections were standardized by excising the xenograft with a small margin of CAM. Subsequently, all xenograft samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C in an ultrafreezer for later protein extraction.

Analysis of CAM samples

For the analysis of tumor growth inhibition and angiogenesis, CAM images were processed using open-source image processing software (Fiji software based on ImageJ, developed at the National Institutes of Health (NIH); Maryland, USA).

1. Growth inhibition test

For the evaluation of tumor growth inhibition, the area of the xenograft (cm²) was measured using the Analyze-Set Measurements plugin. Additionally, the tumor growth inhibition percentage (% TGI) was calculated using the following formula: % TGI = (tumor growth in the untreated group - tumor growth in the treated group) × 100 / tumor growth in the untreated group.

2. Angiogenesis

To evaluate angiogenesis, vascular density (µm) and vascular length density (µm) were measured using the Vessel Analysis plugin.

3. IL-6 secretion (ELISA test)

For protein extraction, the tumor samples were weighed and documented. Each sample was then macerated under cooling, and 1x PBS was added at 10 % of the sample weight, followed by vortex homogenization. The samples were subsequently filtered through gauze and then through a 25 µm filter, and stored at -70 °C until analysis. Following protein extraction from the supernatants, IL-6 secretion was measured in accordance with the technical data sheet provided by the BD OptEIA™ Human IL-6 ELISA Set (BD Biosciences; New Jersey, USA). Absorbance was measured at a wavelength of 450 nm using a spectrophotometer (PerkinElmer® Massachusetts, USA). IL-6 secretion was expressed in mg/ml.

Statistical analysis

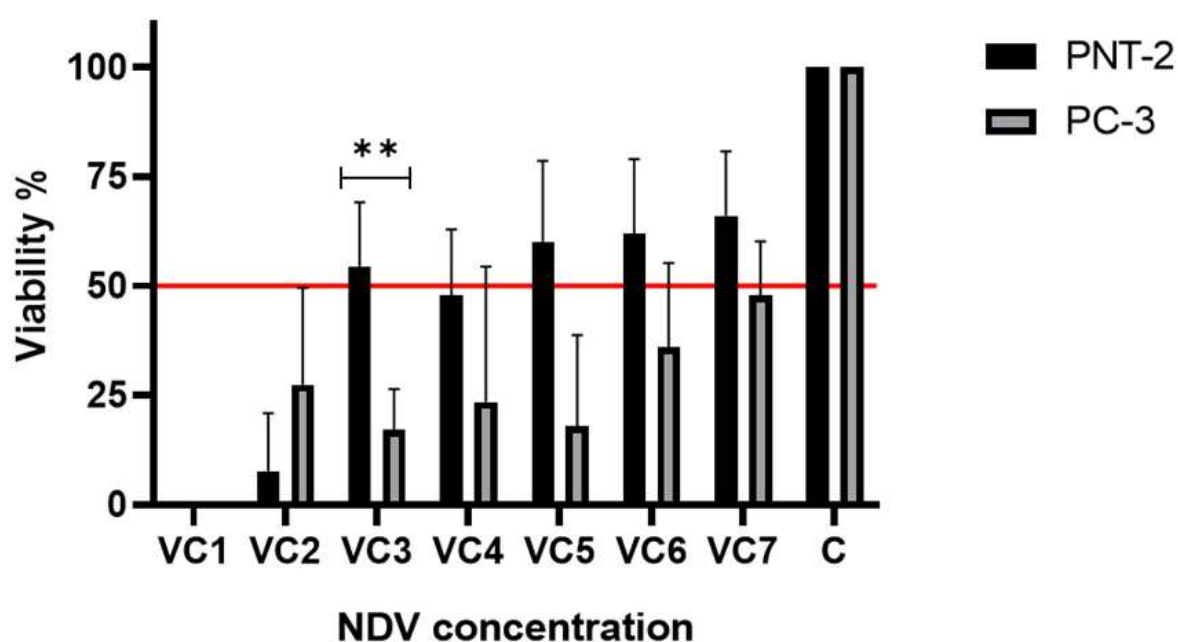
The tests were performed in triplicate. Statistical analyses were conducted using GraphPad Prism 9.5.1 software²⁸ (GraphPad Software; California, USA). Normality was assessed using the Shapiro-Wilk test. Non-parametric data were log-transformed for two-way ANOVA followed by Tukey's test. One-way ANOVA was also performed, followed by Tukey's test. The results were presented as mean values and confidence intervals (CI), with significance defined as $p < 0.05$. A p -value of < 0.1 was considered indicative of a trend.

Results

NDV La Sota strain decreases viability of human prostate cancer cells

The cytotoxicity of NDV was evaluated by exposing PNT-2 and PC-3 cells to decreasing concentrations of the virus for 72 hours (Image 1).

Image 1 - Cell viability analysis after 72 hours (resazurin-based assay) of PC-3 and PNT-2 cells treated with seven different viral concentrations of the La Sota strain of NDV.



C: control group. Significance $p < 0.05$; $**p < 0.01$. Red line indicates 50 % viability.

Fonte: Os autores.

Following treatment 3 (VC3), cell viability in the PC-3 group was significantly lower than in the PNT-2 group [(17.04 % vs. 54.5 %); $**p < 0.01$] at 72 hours. Additionally, cell viability in the PC-3 group was lower than in the control group [(17.04 % vs. 100.00 %); $**p < 0.01$]. The selectivity index (SI) was 34,6.

The CAM model can be used to evaluate the antitumor effect of the Newcastle disease virus La Sota strain on human prostate cancer

High embryonic viability and controlled mortality rate

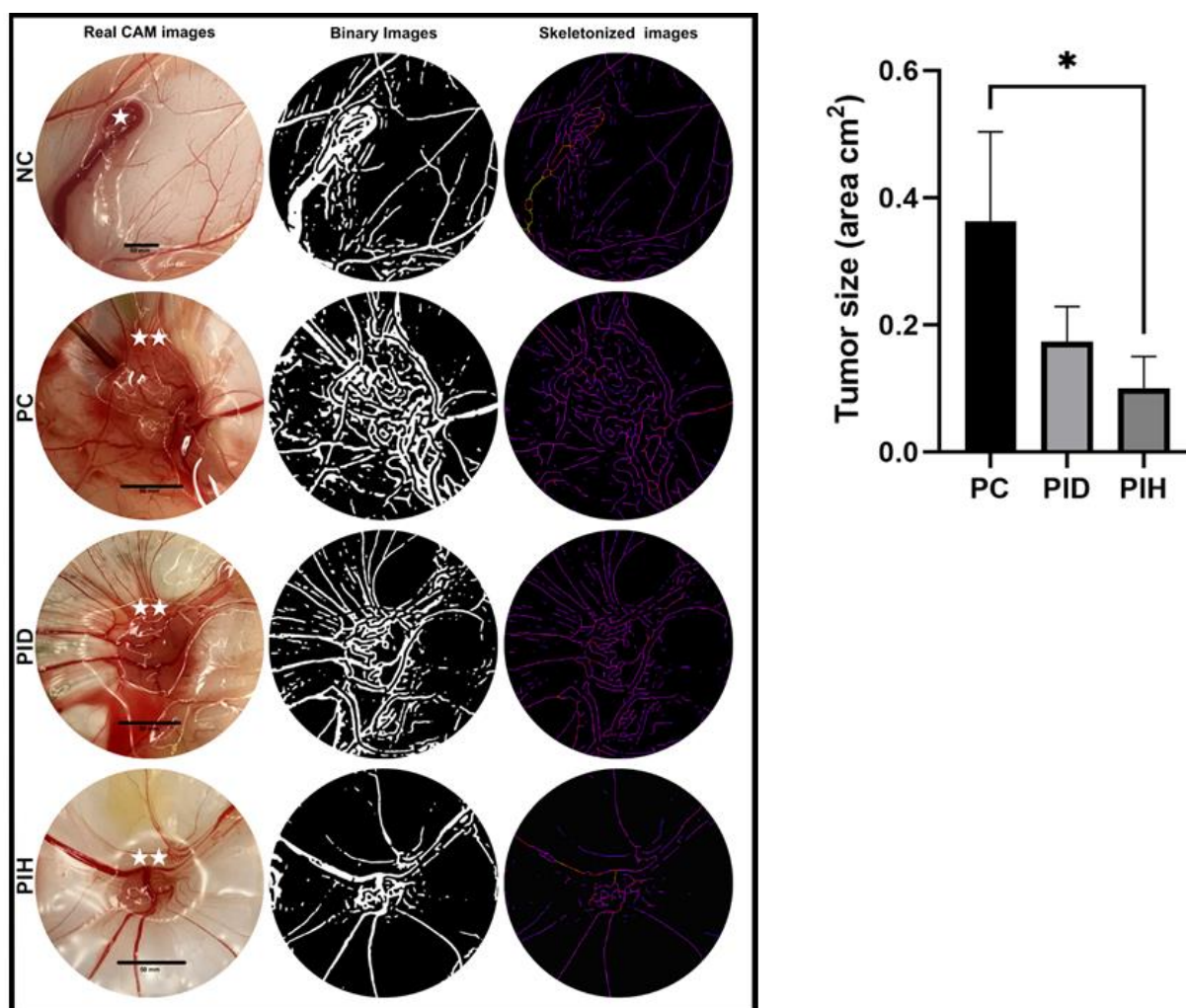
In this study's toxicity assay, no embryonic death occurred after ten consecutive days of observing embryos inoculated with the La Sota strain of NDV on the CAM, resulting in an EV % of 100.0 %.

After seven days of the CAM assay, embryonic mortality was observed in all groups (NC: 1/10; PC: 1/10; PID: 2/10; PIH: 5/10), with an EV % of 77.5 %.

NDV reduced PC-3 tumor size in a treatment-dependent manner

After seven days, a significant reduction in tumor size was observed in the treatment 2 group (PIH) compared to the untreatment group (PC) [(0.10 vs. 0.36) cm²; * $p=0.0301$]. The TGI was calculated as $(0.36 \text{ cm}^2 - 0.10 \text{ cm}^2) / 0.36 \text{ cm}^2 \times 100 = 72.22 \%$. Additionally, after four days of treatment, there was a noticeable decrease in tumor size in the treatment 1 group (PID) compared to the untreatment group (PC) [(0.17 vs. 0.36) cm²; ns=0.0788] (Image 2).

Image 2 - Images of PC-3 xenografts in CAM to evaluate the efficacy of the La Sota strain of NDV.



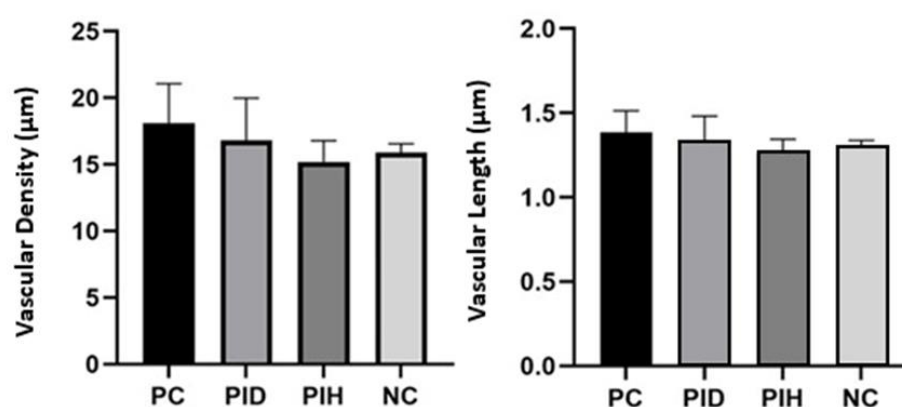
The stars indicate the tumor mass. Scale: 50 mm. On the right, plot of tumor growth inhibition test; significance $p < 0.05$; $*p = 0.023$.

Fonte: Os autores.

NDV did not affect PC-3 tumor angiogenesis

After seven days, vascular density and vascular length density were similar across the groups (Image 3).

Image 3 - Plots showing vascular density and vascular length density of PC-3 xenografts in CE CAM treated with the La Sota strain of NDV.



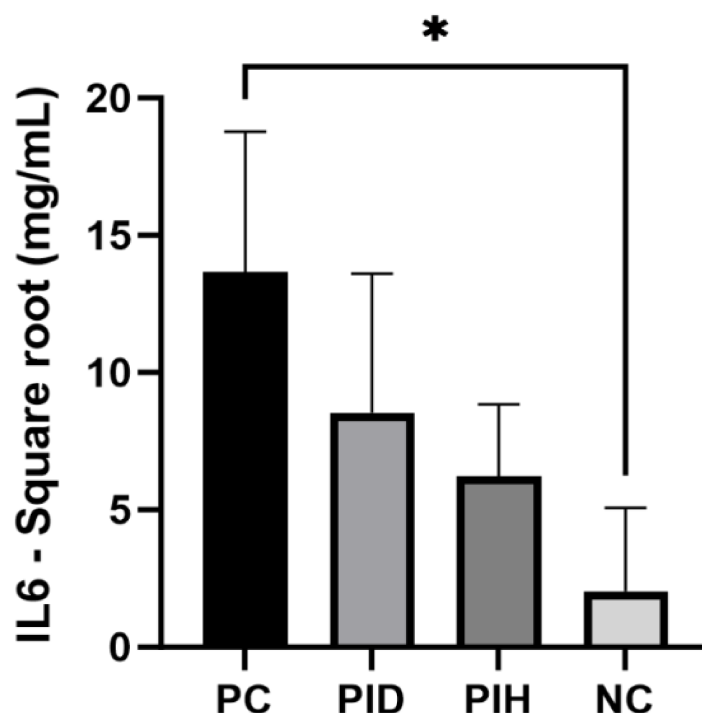
NC (control group); PC (untreated group); PID (treatment 1 group); PIH (treatment 2 group). Significance: $p < 0.05$.

Fonte: Os autores.

PC-3 tumor increases IL-6, but VDN decreases IL-6 at the level of the NC

After seven days, IL-6 secretion was significantly higher in the untreated group (PC), compared to the control group (NC) (Image 4).

Image 4 - Graph showing IL-6 secretion in PC-3 xenografts within CE CAM, treated with the La Sota strain of NDV.



NC (control group); PC (untreated group); PID (treatment 1 group); PIH (treatment 2 group). Significance $p < 0.05$; * $p = 0.0349$.

Fonte; Os autores.

Discussion

The resazurin viability assay was used for the first time on PC-3 cells treated with NDV. This assay is simple, reproducible³⁸, and commonly used in prostate cancer research³⁴. In the cell viability test, NDV induced oncolysis of PC-3 cells within 72 hours (17.04 %) and exhibited a mild cytopathic effect on the non-tumorigenic PNT-2 cell line. A recent study indicated a cytopathic effect in over 40 % of PC-3 cells 72 hours after inoculation with the NDV9B strain of NDV, as assessed by the MTT cell viability test³⁵.

In this study, an *ex vivo* toxicity evaluation was conducted by inoculating NDV into the CAM. Several parameters can be analyzed in toxicity assays in CE, including embryonic mortality³⁹ using different administration routes, including CAM³⁰ and at different stages, such as embryos with 10 EID^{40,41}. No embryo died after topical exposure to NDV for ten consecutive days, from 7 EID to 17 EID. There is a scarcity of information on using the CAM assay to evaluate the oncolytic effect of NDV, a virus that causes mortality in SPF embryos between 9 and 11 EID⁴². However, non-SPF embryos, often descendants of hens vaccinated against NDV, would likely be resistant to viral action, allowing their use to assess NDV's antitumor activity. In this study, non-SPF embryos from vaccinated breeder hens were used, demonstrating the

safety of administering the La Sota strain in non-SPF CE. A previous study used vaccinated CE with the avirulent Ulster strain, of low pathogenicity, like La Sota, and reported no embryopathies, deaths, or viral replication in the normal hepatocytes of the embryos⁴³.

Despite this, when the tumor implantation test on the CAM was conducted, there was mortality. Inoculation into the CAM can lead to mortality, and in this study, deaths were caused by inoculation, as the dead embryos exhibited bleeding in the CAM vessels at the implantation site, which did not occur in the other embryonated eggs. However, a high EV (77.5 %) was observed, corroborating a study reporting high EV (~80 %) in CAM models xenografted with human squamous cell carcinoma (SCC-25) cells⁴⁴.

Additionally, the inhibition of tumor growth after NDV administration on the CAM without affecting EV was also demonstrated. Single-dose treatment (4.60 log PFU/ml) in the treatment group 2 (PIH) was sufficient to inhibit tumor growth by over 70 % in seven days of experimentation. Meanwhile, in the treatment 2 group (PID), administering four single doses of the virus (concentration of 4.60 log PFU/ml) for four consecutive days showed a tendency to decrease tumor size by over 50 %. This result corroborates a study that used a volume of 100 μ l of the AKBA drug for four consecutive days in PC-3 cell xenografts on the CAM, observing a significant decrease in cell proliferation of the xenografts without causing aggressive toxicity in the embryos after necropsy analysis²⁵.

Angiogenesis and IL-6 cytokine secretion by PC-3 cell xenografts on the CAM were also evaluated. After seven days of experimentation, there was no difference in angiogenesis between the treatment 2 group (PID), treatment 3 group (PIH) and the untreatment group (PC), nor between the angiogenesis of the control group (NC) and the untreatment group (PC). Some PC-3 lineage tumors may have low vascularization and reduced blood flow to the tumor microenvironment⁴⁵.

Regarding IL-6, research has shown that the secretion of this cytokine by prostate cancer cells is associated with cell growth, differentiation, and resistance to apoptosis through the activation of ERK/MAPK, JAK-STAT, Src, β -catenin, ERBB1-3, and PI3k-AKTs signaling pathways. Therefore, studies investigating the therapeutic effects of viruses against prostate tumor cells via suppression of IL-6 signaling are relevant and interesting⁴⁶.

A higher secretion of IL-6 was observed in the untreatment group (PC) compared to the control group (NC). Tumors treated with the virus secreted IL-6 at levels similar to those of the control group (NC). This indicates that viral therapy can reduce IL-6, an important cytokine for tumor signaling pathways⁴⁷. Other treatments, in addition to virotherapy, have shown a decrease

in cell proliferation and angiogenesis in prostate tumors associated with reduced IL-6 signaling pathways⁴⁸.

Alternative models like the CE for preclinical testing of the efficacy of oncolytic viruses should be encouraged. This study shows that tests to evaluate the oncolytic activity of NDV and its signaling pathways in CE are viable and safe, confirming the utility of the CAM model for tumor and virotherapy testing.

Conclusions

La Sota strain induced cytotoxicity in prostate tumor cells and reduced tumor size, despite NDV did not affecting tumor angiogenesis. The therapeutic effects of NDV against prostate tumor cells probably are related to suppression of IL-6 signaling.

The CAM assay has been demonstrated for the first time as a safe model for evaluating the antitumor effects of NDV in PC-3 cell xenografts. This work underscores the significant value of CE for testing tumor inhibition through virotherapy.

In the future, it will be necessary to verify the antitumor inhibitory effects of NDV *in vivo*.

Data availability statement

All data are available on the email address: arlindacoleto@hotmail.com.

Ethical statement

All experimental procedures adhered to the current ethical and animal experimentation regulations in Brazil and were approved by the Comissão de Ética na Utilização de Animais of the Universidade Federal de Uberlândia (CEUA), under protocol number 23117.043879/2023-77.

References

1. Shobana R, Samal SK, Elankumaran S. Prostate-specific antigen-retargeted recombinant newcastle disease virus for prostate cancer virotherapy. *J. Virol* 2013; 87:3792–3800.
2. Kaufman HL, Kohlhapp, FJ, Zloza, A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* 2015; 14:642–662.
3. Matsuda T, Karube H, Aruga A. A Comparative Evaluation of the Safety Profile of Oncolytic Virus Therapy Based on Clinical Trials. *Therapeutic Innovation and Regulatory Science* 2017; 52:430–437.
4. Schirmacher V, Fournier P. Newcastle disease virus: a promising vector for viral therapy, immune therapy, and gene therapy of cancer. *Methods Mol Biol* 2009; 542:565-605.
5. OIE Terrestrial manual. In: *Newcastle disease*, 2021, Chapter 3.3.14.
6. Schirmacher V, Bai L, Umansky V, *et al.* Newcastle disease virus activates macrophages for anti-tumor activity. *Int J Oncol* 2000; 16:363-73.
7. Burman B, Pesci G, Zamarin D. Newcastle Disease Virus at the Forefront of Cancer Immunotherapy. *Cancers* 2020; 12:3552.
8. Burke, S. *et al.* Oncolytic Newcastle disease virus activation of the innate immune response and priming of antitumor adaptive responses in vitro. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII, v. 69, n. 6, p. 1015–1027, 1 jun. 2020.
9. Kan, X. *et al.* Newcastle-disease-virus-induced ferroptosis through nutrient deprivation and ferritinophagy in tumor cells. *iScience*, v. 24, n. 8, 2021.
10. Keshavarz, M. *et al.* Oncolytic Newcastle disease virus reduces growth of cervical cancer cell by inducing apoptosis. *Saudi journal of biological sciences*, v. 27, n. 1, p. 47–52, 1 jan. 2020.
11. Song , H. *et al.* Application of Newcastle disease virus in the treatment of colorectal cancer. *World Journal of Clinical Cases*, v. 7, n. 16, p. 2143–2154, 26 ago. 2019.
12. Yang, H. *et al.* The Application of Newcastle Disease Virus (NDV): Vaccine Vectors and Tumor Therapy. *Viruses*, v. 16, n. 6, p. 886, 1 jun. 2024.
13. Zhan, Y. *et al.* Newcastle Disease virus infection activates PI3K/Akt/mTOR and p38 MAPK/Mnk1 pathways to benefit viral mRNA translation via interaction of the viral NP protein and host eIF4E. *PLoS Pathogens*, v. 16, n. 6, p. e1008610, 1 jun. 2020.

14. Rajmani, R. S. *et al.* Oncolytic effect of Newcastle disease virus via immune response in dog mammary tumor xenograft in mice. XX national conference on managing emerging and re-emerging plant, animal, human and aquatic viral diseases: one health perspective held at National Research Centre. Anais...2011. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/273000647_Oncolytic_effect_of_Newcastle_disease_virus_via_immune_response_in_dog_mammary_tumor_xenograft_in_mice
15. Sánchez, D. *et al.* Newcastle Disease virus: potential therapeutic application for human and canine lymphoma. *Viruses*, v. 8, n. 1, 23 dez. 2016.
16. Bilgiç, B.; Dokuzeylül, B.; Or, M. E. Oncolytic virotherapy and the current approaches in veterinary medicine. *German Journal of Veterinary Research*, v. 2, n. 2, p. 17–27, 2022.
17. Nosalova, N. *et al.* Canine Mammary Tumors: Classification, Biomarkers, Traditional and Personalized Therapies. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 5, p. 2891, 1 mar. 2024.
18. Hincke MT, Da Silva M, Guyot N, *et al.* Dynamics of Structural Barriers and Innate Immune Components During Avian Egg Hatching: Critical Interaction Between Autonomous Embryonic Development and Maternal Anticipation. *J Inato Immun* 2019; 11:111-124.
19. Ribatti D. The chicken embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. *Mec Dev* 2016; 141:70–7.
20. Chu PY, Koh AP, Antony J, *et al.* Applications of the Chick Chorioallantoic Membrane as an Alternative Model for Cancer Studies. *Cells Tissues Organs* 2022; 211:222-237.
21. Mapanao AK, Che PP, Sarogni Pet, al. Tumor grafted-chick chorioallantoic membrane as an alternative model for biological cancer research and conventional/nanomaterial-based theranostics evaluation. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2021; 17:947-968.
22. Schütz SV, Schrader AJ, Zengerling F, *et al.* Inhibition of glycogen synthase kinase-3 β counteracts ligand-independent activity of the androgen receptor in castration resistant prostate cancer. *PLoS One* 2011; 6:e25341.
23. Kunzi-Rapp K, Genze F, Küfer R, *et al.* Chorioallantoic membrane assay: vascularized 3-dimensional cell culture system for human prostate cancer cells as an animal substitute model. *J Urol* 2001; 166:1502-7.
24. Kuefer R, Hofer MD, Altug V, *et al.* Sodium butyrate and tributyrin induce *in vivo* growth inhibition and apoptosis in human prostate cancer. *Br J Cancer* 2004; 90:535-

- 41.
25. Syrovets T, Gschwend JE, Büchele B, *et al.* Inhibition of Ikappa B kinase activity by acetyl-boswellic acids promotes apoptosis in androgen-independent PC-3 prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* 2005; 280:6170-80.
26. Estrada AC, Syrovets T, Pitterle K, *et al.* Tirucallic acids are novel pleckstrin homology domain-dependent Akt inhibitors inducing apoptosis in prostate cancer cells. *Mol Pharmacol* 2010; 77:378-87.
27. Dubois E, Hennechart C, Deboosère N, *et al.* Intra-laboratory validation of a concentration method adapted for the enumeration of infectious F-specific RNA coliphage, enterovirus, and hepatitis A virus from inoculated leaves of salad vegetables. *International Journal of Food Microbiology* 2006; 108, 164–171.
28. Pimentel LS, Sommerfeld S, Braga PFS, *et al.* Antitumor activity of essential oils-based nanostructured lipid carriers on prostate cancer cells. *Int J Pharm* 2024; 657:124149.
29. Pereira FC, Lima BA, de Lima AP, *et al.* Cis-[RuCl(BzCN)(N-N)(P-P)]PF₆ complexes: Synthesis and in vitro antitumor activity: (BzCN=benzonitrile; N-N=2,2'-bipyridine; 1,10-phenanthroline; P-P=1,4-bis(diphenylphosphino) butane, 1,2-bis(diphenylphosphino)ethane, or 1,1'-(diphenylphosphino)ferrocene). *J Inorg Biochem* 2015; 149:91-101.
30. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol* 2015; 111.
31. Ribeiro LNM, Schlemper AE, da Silva MV, *et al.* Chicken embryo: a useful animal model for drug testing? *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2022; 26:4828-4839.
32. ACUC. The Use and Euthanasia Procedures of Chicken / Avian Embryos, <https://www.cpp.edu/research/research-compliance/iacuc/docs/iacuc-guidelines-on-euthanasia-of-chicken-and-embryos.pdf> (2012, accessed on January 10, 2023).
33. AVMA. *Guidelines for the Euthanasia of Animals*, <https://www.avma.org/resources-tools/avma-policies/avma-guidelines-euthanasia-animals> (2020, accessed on January 10, 2023).
34. Tan B, Chen X, Fan Y, *et al.* STAT3 phosphorylation is required for the HepaCAM-mediated inhibition of castration-resistant prostate cancer cell viability and metastasis. *Prostate* 2021; 81(9):603-611.

35. Pathak U, Malik N, Pal RB. VDN as an Oncolytic Agent-Study in Cancer Cell Lines. *Biosci Biotech Res Asia* 2022; 19.
36. Anon. Report from the Commission to the Council and the European Parliament, 2019 report on the statistics on the use of animals for scientific purposes in the Member States of the European Union in 2015–2017, In: *Brussels: European Commission*, 2020, pp 21.
37. Anon. The 3Rs. London: NC3Rs, <https://www.nc3rs.org.uk/the-3rs> (2020, acessado em 10 de junho de 2024).
38. Lavogina D, Lust H, Tahk MJ, *et al.* Revisiting the Resazurin-Based Sensing of Cellular Viability: Widening the Application Horizon. *Biosensors* 2022; 12:196.
39. Fonseca BB, da Silva MV, de Moraes Ribeiro LN. The chicken embryo as an *in vivo* experimental model for drug testing: Advantages and limitations. *Lab Animal* 2021; 50(6), 138–139.
40. Elsayed M, Mohamed N, Hatab M, *et al.* Oxidative Stress of in-Ovo Ochratoxin A Administered during Chick Embryonic Development. *Brazilian J. Poult. Sci* 2019; 21.
41. Ribeiro LNM, Fonseca BB. The role of pharmaceutical nanotechnology in the time of COVID-19 pandemic. *Future Microbiol* 2020; 10.2217/fmb-2020-0118.
42. Khorajiya JH, Pandey S, Ghodasara PD, *et al.* Patho-epidemiological study on Genotype-XIII Newcastle disease virus infection in commercial vaccinated layer farms. *Vet World* 2015; 8:372-81.
43. Schirmmacher V, Haas C, Bonifer R, *et al.* 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. *GeneTherapy* 1999; 6:63–73.
44. Sarogni P, Mapanao AK, Marchetti S, *et al.* A Standard Protocol for the Production and Bioevaluation of Ethical In vivo Models of HPV-Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *ACS Pharmacol Transl Sci* 2021; 4:1227-1234.
45. Ma J, Waxman DJ. Dominant effect of antiangiogenesis in combination therapy involving cyclophosphamide and axitinib. *Clin Cancer Res* 2009; 15:578-588.
46. Giannoni E, Bianchini F, Masieri L, *et al.* Reciprocal Activation of Prostate Cancer Cells and Cancer-Associated Fibroblasts Stimulates Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Stemness. *Cancer Res* 2010; 70:6945–56

47. Heidarian E, Keloushadi M. Antiproliferative and Anti-invasion Effects of Carvacrol on PC3 Human Prostate Cancer Cells through Reducing pSTAT3, pAKT, and pERK1/2 Signaling Proteins. *Int J Prev Med* 2019; 10:156.
48. Azevedo A, Cunha V, Teixeira AL, *et al.* IL-6/IL-6R as a potential key signaling pathway in prostate cancer development. *World J Clin Oncol* 2011; 2:384-96.

CAPÍTULO III – Efeito oncolítico da cepa La Sota do vírus da doença de Newcastle em células CMT-U27 e em cadelas com carcinomas mamários: um estudo clínico

Artigo submetido ao periódico

Viruses

Efeito oncolítico da cepa La Sota do vírus da doença de Newcastle em células CMT-U27 e em cadelas com carcinomas mamários: um estudo clínico

Arlinda F. Coletto¹; Belchiolina B. Fonseca²; Vivian Alonso-Goulart³; Luiza G. Dias⁴; Danilo C. Moreira³; Teresiana Velikkakam⁵; Tainá Rodrigues Roque⁶; Simone Sommerfeld⁷; Alessandra A. Medeiros-Ronchi⁸

¹Laboratório de Patologia Animal, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil. Autor correspondente:

arlindacoleto@hotmail.com

²Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil.

³Laboratório de Nanobiotecnologia, Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil.

⁴Clínica de Pequenos Animais, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil.

⁵Laboratório de Tripanossomatídeos, Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil.

⁶Residência Uniprofissional em Medicina Veterinária, Laboratório de Patologia Animal, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil.

⁷Laboratório de Incubação de Aves, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil.

⁸Departamento de Patologia Animal, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil.

Resumo

Os avanços na oncologia veterinária têm permitido o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de tumores mamários em cadelas, uma das neoplasias mais comuns na espécie. Entre essas abordagens, a viroterapia oncolítica surge como uma alternativa promissora, explorando a capacidade de vírus seletivos para destruir células tumorais sem comprometer tecidos saudáveis. O estudo avaliou o efeito oncolítico da cepa La Sota do vírus da doença de Newcastle (VDN) em carcinoma mamário canino, tanto *in vitro* quanto em um teste clínico com três cadelas. Os resultados demonstraram que a linhagem celular tumoral mamária CMT-U27 foi mais suscetível à infecção viral do que as células não tumorais MDCK, com um aumento significativo na morte celular tumoral após 48 horas de exposição. No teste clínico, foram administradas três infusões intravenosas da cepa La Sota do VDN com intervalo

de sete dias entre elas. Eventos adversos de grau I e II (hiperproteinemia, letargia, febre, falta de apetite, conjuntivite) relacionados à terapia viral foram observados em todas as pacientes, mas considerados manejáveis. A resposta à terapia foi heterogênea: uma cadela apresentou estabilização da doença, enquanto duas tiveram progressão tumoral, sugerindo a influência de fatores individuais na eficácia do tratamento. A produção de anticorpos IgG contra o vírus foi detectada em duas pacientes, indicando ativação do sistema imune. Os achados ressaltam a necessidade de protocolos terapêuticos mais estruturados e investigações futuras com maior número de animais e terapias combinadas. Embora preliminares, os resultados *in vitro* e *in vivo* sugerem que o VDN pode ser uma abordagem promissora no tratamento de neoplasias mamárias em cães, contribuindo para o avanço da oncologia veterinária.

Palavras-chave: tumor mamário, viroterapia, canino.

Introdução

A longevidade dos caninos, especialmente as fêmeas, pode chegar a uma média de 12,76 anos (Montoya *et al.*, 2023), evidenciando os avanços na medicina veterinária e a crescente valorização dos cuidados e do bem-estar animal. Na oncologia veterinária, um grande desafio terapêutico são os tumores mamários caninos (TMCs), que são os mais frequentes em cadelas e majoritariamente malignos (Cassali, G. *et al.*, 2020; Cassali; Nakagaki, 2023b)

A realização de estudos clínicos em cães é de vital importância para o desenvolvimento de novas terapias anticâncer, trazendo benefícios tanto para a medicina veterinária quanto para a medicina humana (Kol *et al.*, 2015; Paoloni; Khanna, 2008).

Animais portadores de tumores espontâneos são amplamente utilizados como modelos para a pesquisa de neoplasias humanas (Füirdös *et al.*, 2015), considerados uma opção valiosa para estudos comparativos (Kwon *et al.*, 2023; Vafaei *et al.*, 2022), superiores aos roedores de laboratório (Cekanova; Rathore, 2014)

Os TMCs são reconhecidamente o modelo mais semelhante ao câncer de mama humano. Essa semelhança se dá devido à diversas características: fatores de risco, apresentação clínica, alterações histopatológicas, compartilhamento dos mesmos genes oncogênicos e de supressão tumoral e abordagens cirúrgicas e oncológicas (Abadie *et al.*, 2017; Cejalvo *et al.*, 2018; Cekanova; Rathore, 2014; Hansen; Khanna, 2004; Kwon *et al.*, 2023) o que os tornam especialmente interessantes para estudos de avaliação de tratamentos alternativos para neoplasias malignas.

Tratamentos que fortalecem o sistema imunológico (SI) e aprimoram respostas imunológicas específicas têm o potencial de proporcionar ao paciente uma abordagem eficaz, potente e personalizada no combate ao câncer (Krzyszczuk *et al.*, 2019).

A terapia com vírus nativos ou geneticamente modificados desponta como uma abordagem interessante na oncologia, graças à sua capacidade de eliminar células tumorais enquanto preserva as células normais (Li *et al.*, 2020; Martini *et al.*, 2020). Esses vírus não só destroem tumores com maior acuidade, como também podem desencadear uma resposta imunológica antitumoral robusta e duradoura (Martini *et al.*, 2020). Durante a transformação celular na carcinogênese, muitos mecanismos de defesa antiviral inata tornam-se defeituosos ou suprimidos, tornando as células cancerígenas mais vulneráveis a diferentes cepas virais em comparação a células normais. Esta susceptibilidade é exacerbada pela menor capacidade das células tumorais em responder à estimulação antiviral (Bell; Mcfadden, 2014).

Estudos pré-clínicos e clínicos têm revelado habilidades antineoplásicas impressionantes para a viroterapia oncolítica, mostrando uma toxicidade significativamente menor em comparação com as quimioterapias tradicionais (Duffy; Fisher; Seymour, 2017; Tap *et al.*, 2016).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito oncolítico da cepa La Sota do vírus da doença de Newcastle (VDN) em células de carcinoma mamário canino e em um teste clínico em cadelas portadoras de tumores mamários espontâneos.

Materiais e métodos

Vírus da doença de Newcastle (VDN)

Foi utilizada a cepa La Sota, um vírus lentogênico não recombinante de baixa patogenicidade (Dimitrov *et al.*, 2016). Para a titulação viral, o cálculo foi baseado nas informações do fabricante, onde 50 ml continha $10^{6,2}$ DIE50 (Dose Infectante de 50 %) de NDV vivo, cepa La Sota. A titulação viral inicial de $10^{5,2}$ DIE50 foi utilizada no ensaio de viabilidade celular *in vitro*, descrita na seção '*Teste de viabilidade celular in vitro (ensaio baseado em resazurina)*'.

A fórmula $\text{UFP/ml} = (D/E) \times 1/V$, onde D : título viral inicial em DIE50 ($10^{5,2}$ DIE50), E : unidade de volume transferida em cada concentração (1 ml) e V : volume de concentração final (ml), foi utilizada para a determinação da concentração viral em unidades formadoras de placas (UFP). As contagens de UFP foram convertidas em valores logarítmicos, devido a utilização de diluições decimais do vírus (Dubois *et al.*, 2006). Foi determinada a concentração

que apresentou a maior citotoxicidade para as células CMT-U27 e a menor citotoxicidade para as células MDCK.

Já para o teste clínico, detalhado a partir da seção '*Design e metodologia do teste pré-clínico*', a titulação viral utilizada foi de $5 \times 10^{5.2}$ DIE50, baseado em estudo anterior (Sánchez *et al.*, 2024)

Manipulação de células CMT-U27

Cultura celular

A linhagem celular de carcinoma mamário canino (CMT-U27) foi adquirida da *American Type Culture Collection* (ATCC; Virgínia, EUA), enquanto a linhagem de epitélio renal normal canino (Madin-Darby canine kidney; MDCK) foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Brasil). Ambas as linhagens foram descongeladas em banho-maria a 37 °C (Cientec; Brasil), centrifugadas a 1000 RPM por 5 minutos (Eppendorf; Alemanha) e ressuspendidas.

A linhagem CMT-U27 foi cultivada em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (Gibco, Merck KGaA; Alemanha), enquanto a linhagem MDCK foi mantida em Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), ambos suplementados com 10 % de soro fetal bovino (FBS) (Cultilab; Brasil). As culturas foram incubadas a 37 °C com 5 % de CO₂ em uma incubadora de CO₂ (Forma™ Series II Water-Jacketed CO₂ Incubator; Thermo Scientific™; Massachusetts, EUA).

As células foram monitoradas a cada 48 horas por microscopia de contraste de fase utilizando o sistema de imagem digital invertido EVOS (Thermo Scientific™; Massachusetts, EUA). Quando atingiam confluência, eram submetidas à tripsinização a 37 °C por 5 minutos e transferidas para novos frascos de poliestireno. Todas as linhagens celulares foram mantidas livres de micoplasma, com status confirmado por PCR.

Teste de viabilidade celular in vitro

Ambas as linhagens celulares CMT-U27 e MDCK foram tripsinizadas e contadas usando o protocolo de exclusão de Trypan Blue para avaliar a viabilidade celular. A citotoxicidade foi investigada colorimetricamente através da redução bioquímica da resazurina, utilizando um *kit* de ensaio *in vitro* altamente fluorescente baseado em resorufina (Merck KGaA; Alemanha). Um total de 10×10^3 células/poço foram semeadas em microplacas de 96 poços (Greiner Bio-One; Carolina do Norte, EUA), cultivadas em meio RPMI e EMEM (conforme demanda da linhagem) e incubadas por 24 horas a 37 °C em 5 % de CO₂ (Forma™

Series II Water-Jacketed CO₂ Incubator; Thermo Scientific™; Massachusetts, EUA). Após a adesão, o meio de cultura foi substituído por tratamentos específicos com base nos grupos: grupo T1 (tratamento 1): as células foram tratadas com 100 µL da cepa La Sota do vírus NDV a uma concentração de 5,2 log PFU/ml; grupo T2 (tratamento 2): as células foram tratadas com 100 µL da cepa La Sota do vírus NDV a uma concentração de 4,9 log PFU/ml; grupo T3 (tratamento 3): as células foram tratadas com 100 µL da cepa La Sota do vírus NDV a uma concentração de 4,6 log PFU/ml; grupo T4 (tratamento 4): as células foram tratadas com 100 µL da cepa La Sota do vírus NDV a uma concentração de 4,3 log PFU/ml; grupo T5 (tratamento 5): as células foram tratadas com 100 µL da cepa La Sota do vírus NDV a uma concentração de 4,0 log PFU/ml; grupo T6 (tratamento 6): as células foram tratadas com 100 µL da cepa La Sota do vírus NDV a uma concentração de 3,7 log PFU/ml; grupo T7 (tratamento 7): as células foram tratadas com 100 µL da cepa La Sota do vírus NDV a uma concentração de 3,4 log PFU/ml. As células foram incubadas por 24 e 48 horas a 37 °C em 5 % de CO₂ (Forma™ Series II Water-Jacketed CO₂ Incubator; Thermo Scientific™; Massachusetts, EUA). Durante as primeiras 24 horas, as células foram incubadas com os tratamentos. Subsequentemente, os tratamentos foram removidos e as células foram incubadas com meio RPMI e EMEM (respectivo à linhagem) nas últimas 24 horas. Depois, 10 µl/poço de solução corante resazurina foi adicionado e as linhagens foram reincubadas por 4 horas a 37 °C em 5 % de CO₂ (Forma™ Series II Water-Jacketed CO₂ Incubator; Thermo Scientific™; Massachusetts, EUA). A absorbância foi medida em comprimentos de onda de 570-600 nm usando um espectrofotômetro (PerkinElmer® Massachusetts, EUA). O cálculo da viabilidade pela absorbância foi realizado a partir da fórmula:
$$\frac{((117216 * \text{tratamentos } 570\text{nm}) - (80586 * \text{tratamentos } 600\text{nm}))}{((117216 * \text{controle viavel } 570\text{nm}) - (80586 * \text{controle viavel } 600\text{nm}))} * 100$$
.

Design e metodologia do teste clínico

Seleção dos animais

No período compreendido entre 01 de abril a 30 de setembro de 2024, foram avaliadas cadelas encaminhadas voluntariamente ao Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (HOVET-UFU) para tratamento clínico. As cadelas foram submetidas a exame clínico completo pelo corpo de médicos veterinários do HOVET-UFU, em ambiente hospitalar.

Aqueles animais com suspeita clínica de neoplasia mamária confirmada por meio de exames citológicos e que atendiam aos seguintes critérios de inclusão adaptados de estudos prévios realizados em humanos (Hotte *et al.*, 2007) e animais (Das *et al.*, 2017; King, 2017; Sánchez *et al.*, 2024), foram selecionadas para o estudo: (I) cadelas com idade igual ou superior a cinco anos, apresentando pelo menos um tumor na mama com diagnóstico de carcinoma confirmado por exame de citologia, sem foco(s) tumoral(is) visíveis em outros órgãos, confirmados por radiografia torácica; (II) não possuírem tumores ulcerados e contaminados, doenças autoimunes ou imunossupressoras, comorbidades não controladas, infecções ativas por vírus ou bactérias não controladas; (III) com hemograma e exames bioquímicos dentro dos intervalos de referência (IR) estabelecidos para a espécie (THRALL *et al.*, 2015), com exceção da ureia ($< 1,5$ vezes o limite superior ao IR: 15 - 45 mg/dL), creatinina ($< 1,5$ vezes o limite superior ao IR: 0,5 - 1,5 mg/dL) e alanina aminotransferase (ALT) ($< 2,5$ vezes o limite superior ao IR: ALT 21 - 112 U/L); (IV) não terem sido submetidas a nenhum tipo de cirurgia ou tratamento com medicamentos da classe dos corticosteroides, da classe dos anti-inflamatórios não estereoidais (AINES) ou medicamentos tóxicos para células por, no mínimo, 30 dias da data de início da terapia experimental, bem como nenhum tipo de quimioterapia ou radioterapia por, no mínimo, quatro meses da data de início da terapia experimental; (V) ausência de contato direto com aves de qualquer espécie, idosos acima de 60 anos, crianças ou adultos portadores de doenças autoimunes ou imunossupressoras.

Os responsáveis pelos animais forneceram consentimento prévio mediante assinatura do ‘Termo de consentimento do responsável pelo animal’ e do ‘Termo de consentimento livre e esclarecido para autorização de uso da imagem’. Além disso, os animais selecionados não deveriam ter como responsáveis pessoas que trabalhassem diretamente com aves de qualquer espécie ou que estivessem em período de gestação ou amamentação.

Avaliação das glândulas mamárias

À primeira consulta, foi realizado exame citológico dos nódulos mamários palpáveis, utilizando técnica recomendada (Cassali; Nakagaki, 2023c). Foi realizada visualização e palpação de ambas as cadeias mamárias, a saber: mamas torácicas craniais direita (M1d) e esquerda (M1e); mamas torácicas caudais direita (M2d) e esquerda (M2e); mamas abdominais craniais direita (M3d) e esquerda (M3e); mamas abdominais caudais direita (M4d) e esquerda (M4e), mamas inguinais direita (M5d) e esquerda (M5e); linfonodos inguinais superficiais direito (L1d) e esquerdo (L1e), para observação da localização, coloração, consistência, exsudação, tamanho, volume e qualquer outro parâmetro macroscópico relevante observado na pele, tetos, glândulas e linfonodos das cadelas, em dois momentos: antes do tratamento (AT) e posterior ao tratamento (PT).

A mensuração do comprimento e da largura dos nódulos tumorais palpáveis foi realizada com paquímetro digital (Digimess, Brasil). Já o volume tumoral (em cm³) foi calculado conforme Guo *et al.* (2021), a saber: $0,5 \times X \times Y^2$, onde X = comprimento e Y = largura.

Amostras das glândulas mamárias, tetos e linfonodos regionais provenientes de biopsia realizada por equipe medica cirurgica, foram processadas segundo Tolosa *et al.* (2003) para a confecção de lâminas histológicas e avaliação, independente da presença de nódulos palpáveis. O diagnóstico histopatológico foi realizado em estudo duplo cego por dois patologistas, no Laboratório de Patologia Animal (PAVET-UFU). A classificação histológica foi realizada conforme Goldschmidt *et al.* (2011) e Zappulli *et al.* (2018).

O estadiamento clínico foi realizado utilizando o sistema TNM modificado por Sorensen, Deanna, Goldsmith (2013).

Protocolo terapêutico

O protocolo de infusões intravenosas foi adaptado de Pecora *et al.* (2002), Hotte *et al.* (2007), King (2017) e Sánchez *et al.* (2024). Três infusões (T1, T2 e T3) foram administradas, com intervalo de sete dias entre elas, após a primeira consulta. Cada infusão foi realizada em ambiente ambulatorial e as pacientes foram manipuladas na presença dos tutores.

A contenção física das cadelas foi realizada sobre a mesa de procedimentos, com as pacientes em decúbito esternal. O acesso venoso, por punção da veia cefálica, foi realizado conforme descrito por Ford e Mazzaferro (2013).

Para cada dia de tratamento (T1, T2 e T3), os frascos contendo a vacina com a cepa La Sota do VDN foram retirados de refrigeração e diluídos em bolsas de soro fisiológico estéril de

100 ml, à temperatura ambiente, utilizando seringas estéreis. Dessa primeira bolsa, foram retirados 20 microlitros/kg (0,02 ml/kg) com seringa estéril, que foram diluídos em outra bolsa de soro fisiológico estéril de 100 ml, à temperatura ambiente e, então, infundidos lentamente nas pacientes, dentro de uma hora. Após a viroterapia, as cadelas foram encaminhadas aos cuidados domiciliares, sob a responsabilidade de seus tutores.

Exames clínicos e laboratoriais

Exame físico geral, mensuração dos nódulos palpáveis e coleta de sangue foram realizados na primeira consulta e nos dias das infusões (T1, T2 e T3).

As amostras de sangue foram coletadas em tubos plásticos, com e sem anticoagulante, para realização de hemograma e perfil bioquímico, respectivamente (Thrall *et al.*, 2015). Os resultados dos exames foram avaliados para seleção das cadelas na primeira consulta e depois para monitoramento de eventos adversos (EA) durante o período das infusões, bem como para acompanhamento pós-cirúrgico.

Para a pesquisa de focos metastáticos pulmonares visíveis nas pacientes que foram submetidas ou não à cirurgia, foram realizadas radiografias torácicas, nas posições latero-lateral direita (LLD), latero-lateral esquerda (LLE) e ventro-dorsal (VD), conforme Dias (2012).

Tratamento cirúrgico

Após o término das infusões, as cadelas foram encaminhadas para tratamento cirúrgico. Para assegurar que as pacientes estavam aptas para a cirurgia, foram realizados exames pré-operatórios, incluindo ultrassonografia abdominal (US), eletrocardiograma (ECG), ecodopplercardiograma (ECO), além de hemograma completo e painel bioquímico.

Exames adicionais foram realizados conforme a necessidade de investigação clínica específica de cada caso e paciente.

Dada a complexidade e a variabilidade dos TMC, a escolha da técnica cirúrgica de mastectomia foi individualizada. As indicações seguiram diretrizes gerais ajustadas às necessidades específicas de cada paciente. Portanto, a escolha foi baseada no estado de saúde da paciente, número, tamanho e localização das lesões e presença de ulceração (Cassali *et al.*, 2020; Macphail; Fossum, 2021; Sorenmo *et al.*, 2013).

Amostras das glândulas mamárias e linfonodos regionais provenientes da exérese cirúrgica foram processadas segundo Tolosa *et al.* (2003) para a confecção de lâminas histológicas e avaliação. O diagnóstico histopatológico foi realizado em estudo duplo cego por

dois patologistas, no Laboratório de Patologia Animal (PAVET-UFU). A classificação histológica foi realizada conforme Goldschmidt *et al.* (2011).

Cuidados gerais e específicos com as pacientes

Conforme recomendado anteriormente por Pecora *et al.* (2002), Hotte *et al.* (2007) e Sánchez *et al.* (2016), os tutores foram instruídos e treinados a verificar diariamente a temperatura retal dos pacientes, bem como a relatar quaisquer possíveis EA, detalhados na seção '*Monitoramento de eventos adversos*'. Medicamentos para melhorar a tolerabilidade, como antitérmicos e antieméticos, foram administrados profilaticamente ou conforme necessário.

Em casos mais graves, foram consideradas medidas de suporte, como o tratamento dos efeitos indesejáveis, ajustes na dose ou interrupção do tratamento, dependendo da gravidade e da avaliação clínica individual de cada animal (Sánchez *et al.*, 2024). Para todos os procedimentos realizados nos pacientes animais, foram seguidas as normas de segurança padrão para os tutores e a equipe médica veterinária.

Avaliação das respostas clínicas

Monitoramento de eventos adversos

Os EA foram monitorados diariamente, através de contato telefônico e/ou avaliação clínica das cadelas e graduados para classificação de status de desempenho de 1 a 5, conforme critérios adaptados das terminologias comuns para eventos adversos decorrentes da terapia antineoplásica em cães e gatos, estabelecidos pelo Veterinary Cooperative Oncology Group (LeBlanc *et al.*, 2021). Foi desejável status ≤ 2 .

Um EA foi definido como qualquer sinal clínico desfavorável e não intencional ou doença temporariamente associada às infusões intravenosas da cepa La Sota do VDN, que foram ou não considerados relacionados ao tratamento viral (Leblanc *et al.*, 2021). Cada EA foi considerado um evento isolado, caracterizando uma ocorrência específica (Leblanc *et al.*, 2021).

Assim, uma nota de 1 a 5 foi atribuída para cada EA: (1) não relacionado (EA claramente não apresentava associação com o tratamento viral; (2) improvável (baixa probabilidade de relação entre o EA e o tratamento viral; (3) possível (a relação entre o EA e o tratamento viral não poderia ser descartada; (4) provável (forte evidência de que o EA estava associado com o tratamento viral; e (5) definitivo (a relação do EA com o tratamento viral foi confirmada).

Resposta terapêutica à viroterapia

Para classificar a taxa de resposta terapêutica das pacientes após o tratamento com a cepa La Sota do VDN, foram realizadas avaliações em dois momentos: AT e PT. A avaliação incluiu exame físico geral, exames laboratoriais, medição do volume tumoral, verificação da presença de novos focos tumorais e metástases à distância. Com base nesses critérios, as cadelas foram classificadas de acordo com os critérios adaptados de Cápuia *et al.* (2011), Rossmeisl (2013) e Al-Shammari *et al.* (2019), a saber: (i) DE (doença estável): redução do volume tumoral inferior a 50 % em relação ao volume inicial; ou aumento do volume tumoral inferior a 25 % em relação ao tamanho inicial; ausência de novos focos tumorais nas glândulas mamárias, nos linfonodos locorregionais e em órgãos à distância; (ii) RP (resposta parcial): redução do volume tumoral superior a 50 % em relação ao volume inicial; ausência de novos focos tumorais nas glândulas mamárias, nos linfonodos locorregionais e em órgãos à distância; (iii) RC (resposta completa): redução do volume tumoral em 100 % em relação ao volume inicial; ausência ou redução total de novos focos tumorais nas glândulas mamárias, nos linfonodos locorregionais e em órgãos à distância; (iv) DP (doença progressiva): aumento do volume tumoral superior a 25 % em relação ao volume inicial; ou evidência de novos focos tumorais nas glândulas mamárias, nos linfonodos locorregionais e/ou órgãos à distância, em até seis meses após o fim do tratamento.

Ensaio ELISA para a detecção de anticorpos IgG contra o VDN

O nível sérico de anticorpos IgG presentes nas cadelas foi avaliado em três momentos (AT, DT e PT). Amostras de sangue venoso foram coletadas e foram feitas alíquotas de 500 µL de soro armazenadas a -80°C em *ultrafreezer*.

Primeiramente, foi realizado o teste Dot-ELISA. Membranas de nitrocelulose foram sensibilizadas com vírus puro. Uma vez secas, realizou-se o bloqueio de ligações inespecíficas com solução de albumina de soro bovino (BSA) a 3 %, a 37 °C por 30 minutos. Em seguida, realizaram-se três lavagens com PBS Tween 0,05 % (PBS-T) e incubou-se com *pool* de soro das pacientes, conforme os grupos AT e PT, por 30 minutos a 37 °C com o pool de soro na diluição 1:100. Após mais três lavagens com PBS Tween 0,05 %, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG canino produzido em coelho (Sigma-Aldrich, CLONE; conjugado com HRP), diluído na proporção de 1:5000 em PBS contendo 0,5 % de BSA, por 30 minutos a 37 °C. Outra série de três lavagens com PBS Tween 0,05 % foi realizada e, posteriormente, foi adicionado o substrato DAB (diaminobenzidina) por um período de 10 minutos para a revelação da cor. Pontos circulares na membrana indicaram positividade. Foram utilizados controles positivos (vírus + soro) e controles negativos (soro + anticorpo; vírus +

anticorpo; tampão). A absorbância foi medida a um comprimento de onda de 492 nm usando um espectrofotômetro (PerkinElmer®, Massachusetts, EUA).

Posteriormente, foi realizado teste ELISA. A placa de ELISA high-binding (Corning, Nova York, EUA) foi sensibilizada com extrato de vírus puro, a 4 °C, *overnight*. No dia seguinte, a placa foi lavada uma vez com PBS e uma vez com PBS-T, seguido pelo bloqueio com BSA 3 % durante uma hora a 37 °C. Após outra lavagem com PBS-T, foram realizadas as incubações conforme os grupos AT, DT e PT. A placa foi incubada por uma hora a 37 °C, lavada três vezes com PBS-T, tratada com anticorpo secundário anti-IgG canino (50 µL/poço) produzido em coelho (Sigma-Aldrich, CLONE; conjugado com HRP) e incubada novamente a 37 °C. Após três lavagens com PBS-T, a reação foi revelada com o reagente OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride; Thermo Scientific™; Massachusetts, EUA) por 15 minutos protegido da luz. Foi aplicado ácido sulfúrico aos poços para parar a reação. A placa foi lida na absorbância de 492 nm usando um espectrofotômetro (PerkinElmer®, Massachusetts, EUA).

Análises estatísticas

Viabilidade celular

Para as análises de viabilidade celular foi aplicado o teste de análise de variância de dois fatores (2-way ANOVA) e o teste de comparações múltiplas de Tukey.

Os valores de IC50 (concentração inibitória de 50%) foram determinados usando curvas sigmoidais de dose-resposta. O índice de seletividade (IS) foi considerado significativo de (IS) ≥ 2 .

Volume tumoral

Foi realizada estatística descritiva para melhor observação da redução e da progressão tumoral, demonstradas em gráfico.

Ensaio ELISA IgG

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para testar a normalidade dos dados e, posteriormente, foi aplicado o teste de análise de variância de dois fatores (2-way ANOVA).

Software para as análises estatísticas

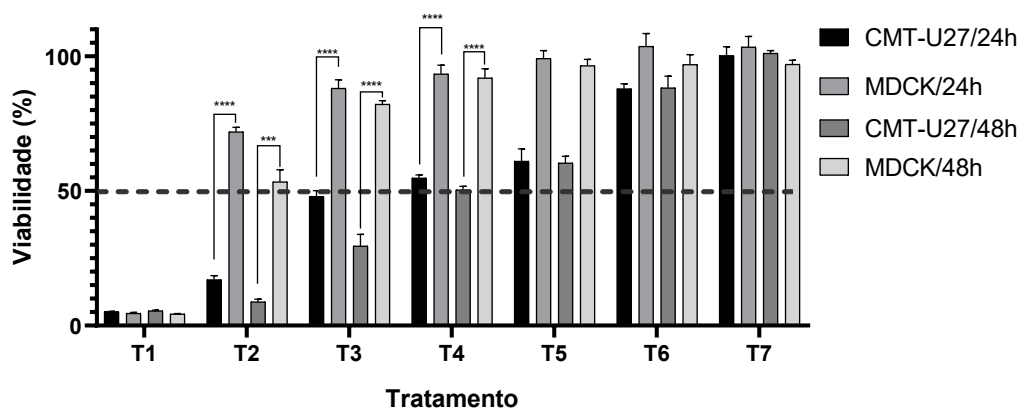
Todos os dados foram tabulados e analisados no GraphPad Prism versão 8 ou 9 (GraphPad Software, Califórnia, EUA). Os resultados foram apresentados como valores médios e intervalos de confiança (IC). Considerou-se significância estatística para $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

A cepa La Sota do VDN é eficaz em induzir a destruição das células CMT-U27 in vitro, sem causar toxicidade às células não tumorais

A toxicidade celular pela cepa La Sota do VDN foi avaliada expondo as células CMT-U27 e MDCK à diferentes concentrações do vírus por 24 e 48 horas (**Error! Reference source not found.**).

Figura 1 - Avaliação da viabilidade celular após 24 e 48 horas em células CMT-U27 e MDCK tratadas com sete diferentes concentrações (tratamentos T1 a T7) da cepa La Sota do VDN.



CMT-U27: células caninas de carcinoma mamário; MDCK: células renais caninas Madin-Darby; T1 (grupo tratamento 1): células tratadas com 100 µL da cepa La Sota do vírus NDV a uma concentração de 5,2 log PFU/ml; T2 (grupo tratamento 2): células tratadas com 100 µL da cepa La Sota do vírus NDV a uma concentração de 4,9 log PFU/ml; T3 (grupo tratamento 3): células tratadas com 100 µL da cepa La Sota do vírus NDV a uma concentração de 4,6 log PFU/ml; T4 (grupo tratamento 4): células tratadas com 100 µL da cepa La Sota do vírus NDV a uma concentração de 4,3 log PFU/ml; T5 (grupo tratamento 5): células tratadas com 100 µL da cepa La Sota do vírus NDV a uma concentração de 4,0 log PFU/ml; T6 (grupo tratamento 6): células tratadas com 100 µL da cepa La Sota do vírus NDV a uma concentração de 3,7 log PFU/ml; T7 (grupo tratamento 7): células tratadas com 100 µL da cepa La Sota do vírus NDV a uma concentração de 3,4 log PFU/ml. Significância se $p < 0,05$. A linha horizontal representa 50% de viabilidade.

Fonte: Os autores.

A linhagem celular tumoral CMT-U27 foi mais suscetível à infecção pela cepa La Sota do VDN, em comparação à linhagem de células normais MDCK, após o tratamento T2, pelo índice de seletividade, em 24 horas (IS = 4,21) e em 48 horas (IS = 6,08).

Além disso, após os tratamentos T2, T3 e T4, a viabilidade das células MDCK permaneceu superior a 50,0% e foi significativamente maior em comparação com as células CMT-U27, em 24 horas (T2 **** $p < 0,0001$; T3 **** $p < 0,0001$; T4 **** $p < 0,0001$). Após 48 horas, houve um aumento acentuado e significativo na morte celular tumoral, mantendo a viabilidade das células não tumorais elevada, após os tratamentos T2 (** $p = 0,0001$), T3 (**** $p < 0,0001$) e T4 (**** $p < 0,0001$).

Os dados observados corroboram outros estudos, como o de Santos *et al.* (2021) que utilizaram uma versão modificada da cepa La Sota, que expressava a proteína fluorescente verde (VDN-GFP), para avaliar a citotoxicidade do vírus em linhagens tumorais de neoplasias epiteliais (E20 e E37) e mesenquimais mamárias caninas (M5, M25 e CF41.Mg), além da linhagem MDCK. Os resultados mostraram que todas as linhagens tumorais foram mais suscetíveis ao VDN-GFP (IS=3,1). Já no estudo de Wang *et al.* (2023), foi avaliado o efeito do tratamento da cepa La Sota nas células tumorais CMT-U27 e nas células normais MDCK, em 24 e 48 horas. O teste de viabilidade celular pelo teste CCK-8 (Cell Counting Kit-8), mostrou que a viabilidade das células CMT-U27 foi significativamente reduzida ao longo do tempo, enquanto as células MDCK não apresentaram alterações.

Estudo in vivo

Tratamento intravenoso

A administração de repetidas doses intravenosas do VDN já foi relatada como segura em diversos estudos em humanos (Hotte *et al.*, 2007; Lam *et al.*, 2011; Laurie *et al.*, 2006; Pecora *et al.*, 2002) e em caninos (Das *et al.*, 2017; King, 2017; Rossmeisl *et al.*, 2024; Sánchez *et al.*, 2024).

O regime terapêutico escolhido para o teste clínico foi de três infusões intravenosas da cepa La Sota e a concentração eleita foi de $5 \times 10^{5,2}$ DIE50. Não há uma padronização estabelecida na literatura veterinária e humana em relação à dosagem e ao cronograma terapêutico (King, 2017). Diversos protocolos estão sendo avaliados para definir a abordagem mais eficaz. No presente estudo, optou-se por uma dose inferior à utilizada por Sánchez *et al.* (2024), que administraram uma única infusão intravenosa, a uma concentração de $1 \times 10^{6,88}$ DIE50 em cadelas com cânceres mamários espontâneos.

Parâmetros clínicos e laboratoriais das pacientes

Diferentes avaliações clínico-patológicas e intervenções veterinárias foram realizadas nas três pacientes ao longo de 245 dias de estudo. O primeiro dia de consulta foi considerado com dia zero (Apêndice A)

As pacientes do presente estudo apresentaram idade média de 10,37 anos, escore corporal elevado (1/3 ou 33,33%), não eram castradas no início do tratamento (3/3 ou 100%) e 67% (2/3) possuíam histórico de uso prolongado de progestágenos. De acordo com Cassali *et al.* (2020), fatores como idade avançada, obesidade, ausência de castração e uso de progestágenos estão associados a um maior risco de desenvolvimento de neoplasias mamárias em cadelas, o que sugere que as características observadas nas pacientes deste estudo podem estar relacionadas a essa predisposição.

Houve predominância de nódulos palpáveis nas glândulas mamárias abdominais e inguinais nas três pacientes. As neoplasias mamárias caninas têm como predileção as glândulas M4 e M5, em cerca de 65 a 70% dos casos, sendo que mais de 50% das cadelas afetadas desenvolvem múltiplos tumores (Cassali *et al.*, 2020)

Antes do tratamento, a paciente 1 possuía nódulos palpáveis na M2d, M1e, M4e, M5e, sendo submetida à mastectomia unilateral direita, onde estava localizado o tumor maior. A paciente 2 apresentava nódulos palpáveis na M4d, M5e, sendo submetida à mastectomia unilateral direita, para a retirada do tumor maior, como recomendado (Cassali, et al., 2020). Para cadelas com lesões tumorais múltiplas em uma única cadeia mamária, a mastectomia unilateral é indicada (Papazoglou, 2012), bem como para a detecção e avaliação de lesões pré-neoplásicas (Cassali; Nakagaki, 2023a). Já a paciente 3 possuía nódulos palpáveis na M4d, M5d, M4e, M5e, entretanto, não foi submetida à cirurgia por decisão do tutor.

À análise histopatológica, a paciente 1 apresentou diagnóstico de carcinoma tubulopapilar grau 1 cístico (M2d) (Figura 2, B), carcinoma tubulopapilar grau 1 (M4d, M5d), carcinoma *in situ* baixo grau (M3d), hiperplasia lobular com atipia (M1d, M4d) e não havia metástase no linfonodo satélite (inguinal direito). A paciente 2 foi diagnosticada com carcinoma em tumor misto grau 1 (M4d) (Figura 2, E) e não havia metástase no linfonodo satélite (inguinal direito). A paciente 3 não foi submetida à cirurgia para a retirada dos nódulos mamários.

Perfil hemograma e bioquímico

Os dados hematológicos e bioquímicos das pacientes, ao longo do experimento, estão detalhados na Tabelas 1.

Tabelas 1 - Eritrograma, leucograma, plaquetograma e bioquímicos de cadelas portadoras de tumores mamários espontâneos, tratadas com a cepa La Sota do vírus da doença de Newcastle.

Paciente	1			2			3		
Parâmetros Tratamento	AT	DT	PT	AT	DT	PT	AT	DT	PT
Eritrograma									
Hemácias: 5,5 - 8,5 x 10 ⁶ /µL	7,1	6,27	7,97	7,53	6,66	7,38	7,26	6,79	7,27
Hemoglobina: 12 - 18 g/dL	14,8	13,1	16	17,7	15,2	17,1	17,8	16,9	17,2
Hematócrito: 37 - 55 %	45,5	40,2	48	54,1	45	50	52,3	48,8	50,4
VCM: 60 - 77 fL	64	64,2	60,2	71,9	67,5	67,8	72	72	69,3
HCM: 21,9 - 26,3 pg	71	20,8	20	23,5	22,8	23,2	24,5	24,8	23,7
CHCM: 31 - 35 g/dL	14,8	32,5	33,3	32,7	33,7	34,2	34	34,8	34,1
RDW: 13,2 - 19,1 %	NR	14,3	12,2	11	10,7	11,7	10,6	10,4	10,6
Leucograma									
Leucócitos totais: 6 - 17 x 10 ³ /µL	6,8	5,8	9,1	8,1	9,6	6,7	10,9	21,9	12,2
Mielócitos: 0 /µL	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Metamielócitos: 0 /µL	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bastões: 0 - 300 /µL	0	58	0	0	0	0	0	219	122
Neut. seg.: 3.000 - 11.500 /µL	4216	1972	4550	6075	6240	4489	5995	14235	5978
Eosinófilos: 150 - 1.250 /µL	136	290	273	489	480	536	654	1095	1220
Basófilos: (raros)	0	0	0	81	0	0	0	0	0
Monócitos: 150 - 1.350 /µL	68	348	364	162	288	355	327	1314	244
Linfócitos: 1.000 - 4.800 /µL	1564	3132	3913	1134	2592	1340	3924	5037	4636
Plaquetograma									
Plaquetas: 200 - 500 x 10 ³ /µL	383	353	213	352	414	290	416	246	300
VPM: 9,0 - 12,6 fL	12	11,5	9	10	11	11	12,1	NR	12,2
PDW: 9,3 - 18,9 fL	16,3	14,5	14,9	11,3	13	13,3	14,2	NR	14,5
Proteínas plasmáticas: 6,0 - 8,0 g/dL	9	8,6	9	7,4	7	7,8	8,8	9	9
Bioquímicos									
Albumina: 2,6 - 3,3 g/dL	3,73	3,89	3,56	4,19	4,33	4,09	3,29	3,41	3,12
ALT: 21 - 102 U/L	29	89	42	40	NR	28	50	NR	44
Creatinina: 0,5 - 1,5 mg/dL	1,12	0,92	0,43	1,12	0,88	1,22	1,09	0,69	0,59
FA: 20 - 156 U/L	108	114	107	49	53	44	96	129	87
GGT: 1,2 - 6,4 U/L	3,3	5,4	2	3,4	3	3,2	2,8	3,5	3,4
Ureia: 15 - 45 mg/dL	32,6	28,1	24,8	25,5	34,6	34,8	34,3	27,3	32,4

VCM: Volume Corpuscular Médio; MCV: Mean Corpuscular Volume; HCM: Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; RDW: Largura de Distribuição das Células Vermelhas; Neut. Seg.: Neutrófilos Segmentados; VPM: Volume Médio de Plaquetas PDW: Largura de Distribuição das Plaquetas.; ALT: Alanina Aminotransferase; FA: Fosfatase Alcalina; GGT: Gama-Glutamil Transferase; NR: Não realizado. Destaque laranja: acima do valor de referência para a espécie canina. Destaque lilás: abaixo do valor de referência para a espécie canina.

Fonte: Os autores.

Eventos adversos

Foram documentos EA nas três pacientes (Tabelas 2).

Tabelas 2 - Eventos adversos documentados durante e após o tratamento com infusões intravenosas da cepa La Sota do vírus da doença de Newcastle, em cadelas portadoras de neoplasias mamárias espontâneas, de acordo com o VCOG (Leblanc *et al.*, 2021).

Categoria	Grau	Descrição do EA	Paciente	P1	P2	P3
Sangue						
Hemólise	I	Evidência laboratorial apenas de hemólise				
Linfocitose	II	>4000/ μ L				
Neutropenia	I	< limite inferior do normal				
Hipocromia	I	Apenas observações diagnósticas				
Leucopenia	I	Apenas observações diagnósticas				
Leucocitose	II	Moderada; intervenção local indicada				
Neutrofilia	I	<50 000/ μ L				
RDW	I	Apenas observações diagnósticas				
Hiperproteinemia	II	Moderada; intervenção local indicada				
Arritmia cardíaca						
Taquicardia sinusal	I	Assintomático, intervenção não indicada				
Complexo atrial prematuro	I	Assintomático, intervenção não indicada				
Sinais clínicos constitucionais						
Letargia	I	Atividade diminuída em relação ao nível pré-doença, mas capaz de se comportar como um pet				
Febre	I	39.5-40.0°C				
Gastrointestinal						
Apetite alterado	I	Diminuição do apetite com duração $\leq$ 1 semana				
Vômito	I	Vômitos com duração $\leq$ 24 h que se resolvem com o uso de medicamentos				
Metabólico						
Albuminemia	I	Apenas observações clínicas ou diagnósticas				
Hipocreatinemia	I	Apenas observações clínicas ou diagnósticas				
Ocular						
Glaucoma	IV	Pressão intraocular elevada resultando em cegueira; enucleação indicada				
Conjuntivite	II	Secreção sintomática; interferindo na função; intervenção tópica indicada				
Pulmonar/Respiratório						
Edema pulmonar	V	Morte				

EA: evento adverso; P1: paciente 1; P2: paciente 2; P3: paciente 3.

Fonte: Os autores.

Persistem preocupações sobre a segurança do uso de terapias virais em humanos, especialmente no que diz respeito aos EA (Wang *et al.*, 2023). No entanto, espera-se que tais eventos sejam predominantemente leves a moderados e transitórios, minimizando assim os riscos a longo prazo para os pacientes.

Foi observada hemólise leve (grau I) nos exames de hemograma antes, durante e após o tratamento viral, em todas as pacientes (100 %). Neoplasias podem causar hemólise (Hunter; Llera; Ward, 2023). A hemólise foi, portanto, atribuída à doença neoplásica, não relacionada ao tratamento viral.

Ainda pela análise dos hemogramas, todas as pacientes (100 %) apresentaram níveis levemente elevados de albumina (grau I), em um dos três momentos (AT, DT, PT). Além disso, foi observada uma leve hiperproteinemia (grau II) em duas pacientes (P1, P3; 66,67 %). A hiperproteinemia pode ocorrer em animais com desidratação ou quando há aumento da síntese de globulinas no sangue (Meyer; Harvey, 2004). Sánchez *et al.* (2024) relataram hiperglobulinemia após terapia viral com uma infusão intravenosa e uma injeção intratumoral

da cepa NDV-MLS do VDN, em cadelas portadoras de carcinomas mamários espontâneos. A hiperproteinemia foi, portanto, associada à viroterapia.

Em todas as pacientes (100 %), o RDW estava levemente abaixo do VR (grau I), no entanto, o VCM permaneceu normal. A análise do RDW (distribuição do tamanho dos eritrócitos) em combinação com o volume corpuscular médio (VCM) pode oferecer informações mais detalhadas sobre a classificação das anemias. Quando o VCM se mantém dentro do VR e o RDW está elevado, pode-se sugerir deficiência inicial de ferro, cobalamina ou folato, bem como doenças hepatobiliares crônicas (Martinez *et al.*, 2019). Portanto, o valor do RDW não foi relacionado ao tratamento viral.

A paciente 3 desenvolveu conjuntivite grau II dois dias após a segunda infusão intravenosa. Foi encaminhada a um oftalmologista, no entanto, o tutor optou por tratamento tópico com soro fisiológico. Seis dias depois, a paciente apresentou leucocitose grau II, neutrofilia grau I e linfocitose grau II. Novamente foi recomendada a consulta com um especialista oftalmológico para a prescrição de medicamentos adequados. Vinte e um dias depois, os parâmetros do leucograma estavam normalizados. Conjuntivite também foi relatada por Das *et al.* (2017) após a primeira infusão da cepa velogênica VDN2K17 purificada do VDN, no pós-operatório de 33,33 % das cadelas portadoras de carcinomas mamários espontâneos de grau III e metástase para os linfonodos regionais, que foi revertida com terapia de suporte. Já Sánchez *et al.* (2024) observaram neutrofilia discreta (33,33 %) e linfocitose (16,67 %) após terapia viral a cepa NDV-MLS do VDN. O aumento de leucócitos no sangue geralmente está associado a respostas inflamatórias (THRALL *et al.*, 2015). Sendo assim, a conjuntivite, bem como as alterações do leucograma, foram associadas à viroterapia.

No entanto, cinco meses e dezessete dias após a conclusão do tratamento viral, a paciente 3 foi encaminhada ao HOVET-UFU com opacidade de córnea e perda de visão no olho esquerdo, além de secreção ocular bilateral. A oftalmoscopia revelou aumento da pressão intraocular, resultando no diagnóstico de glaucoma (grau IV), possivelmente associado à presença de uma massa intraocular no olho esquerdo. Os exames hematológicos, bioquímicos e urinários encontravam-se dentro dos padrões de referência. Além disso, não houve evidência de metástases visíveis pela radiografia torácica. Não foi possível entrar em contato com o tutor para acompanhar a evolução do quadro clínico.

Os olhos foram o segundo local de metástase extraocular de carcinoma mamário (4,20 % dos casos) em cadelas necropsiadas, de 8 a 14 anos de acordo com Bandinelli *et al.* (2020). Em 70,0 % dos casos, o envolvimento foi unilateral, com disseminação embólica ou obstrutiva dentro dos vasos sanguíneos da úvea, principalmente no corpo ciliar (Bandinelli *et al.*, 2020).

Posto isto, o glaucoma foi atribuído à progressão da doença neoplásica e os pesquisadores consideraram improvável a relação com o tratamento viral.

A paciente 2 apresentou arritmia (grau I) durante exame eletrocardiográfico pré-cirúrgico, seis dias após a primeira infusão intravenosa, apresentando ritmo sinusal predominante, com episódios de taquicardia sinusal e registro de um complexo atrial prematuro. Já no exame ecocardiográfico com Doppler, realizado no mesmo dia, os parâmetros cardíacos estruturais estavam dentro da normalidade para a espécie, raça e idade da paciente. Três meses e quatro dias depois, a paciente foi submetida à cirurgia com uso de anestésicos inalatórios, sem intercorrências. O estresse agudo pode gerar uma série de respostas fisiológicas, incluindo alterações na função cardiovascular (Andrade Braga *et al.*, 2016). Já complexos atriais prematuros (CAP) em cães são mais frequentes em cães idosos e de raças pequenas (Mendonça *et al.*, 2022). Portanto, a arritmia não foi relacionada à viroterapia.

A paciente 1 apresentou hipocreatinínemia (grau I) e esta foi atribuída à perda de massa muscular. A paciente ganhou 300 g durante o tratamento, mas perdeu 800 g devido à progressão da doença. A concentração de creatinina é influenciada pela massa muscular, o que pode resultar em variações significativas nos valores basais, dependendo da raça canina. Por isso, o uso de uma única faixa de referência para todos os cães pode reduzir a sensibilidade do exame (SEGEV, 2018). Portanto, a hipocreatinínemia não foi relacionada à viroterapia.

Sinais clínicos constitucionais e gastrointestinais, semelhantes à gripe, incluindo letargia grau I (P1, P2, P3; 100%); febre grau I (P2, P3; 66,67 %); apetite alterado grau I (P1, P2; 66,67%) e vômito grau I (P2; 33,33%), foram observados em todas as pacientes (100 %). Foram prescritos antitérmico e antiemético após os episódios de febre e vômito, além de serem indicados como profilaxia para as infusões subsequentes, sem novas intercorrências. Sugeriu-se uma alteração na palatabilidade do alimento para estimular o apetite. Todos os sinais clínicos se normalizaram após o término do protocolo terapêutico.

Sintomas semelhantes à gripe, como febre, náuseas/vômitos foram documentados em pacientes humanos tratados com a cepa La Sota do VDN (Laurie *et al.*, 2006; Pecora *et al.*, 2002) e em cadelas com tumores mamários espontâneos (Das *et al.*, 2017; Sánchez *et al.*, 2024). Das *et al.* (2017) observaram febre e apetite diminuído, com duração de 3 a 4 dias após a primeira infusão da cepa velogênica VDN2K17 purificada do VDN. A febre leve é uma resposta comum a tratamentos que envolvem a modulação do sistema imunológico (Sánchez *et al.*, 2024). Apetite diminuído durante tratamentos virais exige mudanças na dieta ou estímulo para manter o apetite (Sánchez *et al.*, 2024). Já Sánchez *et al.* (2024), documentaram ligeira letargia/fadiga/desempenho geral (grau I) em 33,33 % das pacientes; febre grau I em 50,00 %

e apetite alterado grau I em 66,67 % dos casos. A letargia leve indica um estado de cansaço ou diminuição da atividade normal, geralmente transitória e está associada à ativação do sistema imunológico durante terapias virais (Sánchez *et al.*, 2024). Esses sinais clínicos são geralmente considerados esperados e, portanto, foram relacionados ao tratamento viral e à ativação do sistema imunológico.

Em relação à avaliação do sistema respiratório, a paciente 1, que antes do tratamento não possuía metástases pulmonares visíveis radiograficamente (**Error! Reference source not found.**, A), foi encaminhada ao HOVET-UFU para a realização de radiografia torácica, dois meses e um dia após a cirurgia **Error! Reference source not found.**, C). O laudo radiográfico apontou um padrão intersticial estruturado que levou à suspeita de neoplasia primária e/ou metastática, abscesso ou granuloma. A paciente 1, apesar de já ter sido submetida à mastectomia unilateral, ainda era portadora de quatro nódulos localizados na cadeia mamária esquerda, com diagnósticos citológicos de carcinoma.

Cinco meses e cinco dias depois da última infusão intravenosa, a paciente apresentou apatia e desconforto respiratório; recebeu prescrição medicamentosa de diurético e corticosteroide e foi encaminhada para drenagem torácica. Dois dias depois, a paciente foi internada na UTI (unidade de tratamento intensivo) do HOVET-UFU e colocada em soroterapia. Em 24 horas, foram drenados 349 ml de líquido pleural da lado direito e 241 ml do lado esquerdo.

A análise citológica da efusão pleural foi inconclusiva, entretanto, não foram observados microrganismos. No dia seguinte, a paciente teve alta hospital com prescrição medicamentosa de analgésico, anti-inflamatório não esteroide (AINE) e encaminhamento para oncologista, no entanto, tutor não optou pela quimioterapia.

Após dois dias da alta hospitalar, a paciente retornou ao HOVET-UFU com melhora do quadro clínico, no entanto, foi detectada crepitação caudal do pulmão direito e sopro de grau III. O tutor não autorizou a realização de US torácica. Foi solicitado que a paciente retornasse ao HOVET-UFU cinco dias depois e os tutores relataram poliúria, polidipsia e vômito. Cinco dias depois a paciente veio a óbito e o tutor não autorizou o exame necroscópico para determinação da causa *mortis*. Posto isto, o edema pulmonar não foi relacionado ao tratamento viral e sim à progressão da doença neoplásica.

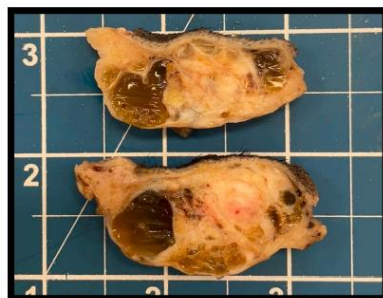
Figura 2 - Cadelas tratadas com três infusões intravenosas da cepa La Sota do vírus da doença de Newcastle.

Paciente 1

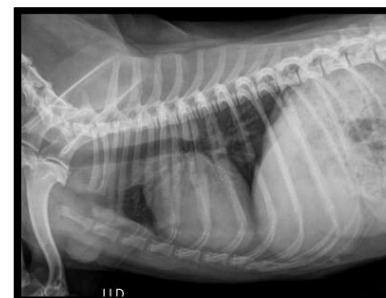
A) Dia 58



B) Dia 92



C) Dia 154



Paciente 2

D) Dia 42



E) Dia 147



F) Dia 209



A) Paciente 1, dia 58: ausência de metástases pulmonares visíveis radiograficamente, antes do início do tratamento. B) Paciente 1, dia 92: nódulo em mama torácica caudal direita; C) Paciente 1, dia 154: padrão intersticial estruturado que levou à suspeita de neoplasia primária e/ou metastática, abscesso ou granuloma. D) Paciente 2, dia 42: ausência de metástases pulmonares visíveis radiograficamente, antes do início do tratamento. E) Paciente 2, dia 147: nódulo em mama abdominal caudal direita. F) Paciente 2, dia 209: ausência de metástases pulmonares visíveis radiograficamente. LLD = posição laterolateral direita.

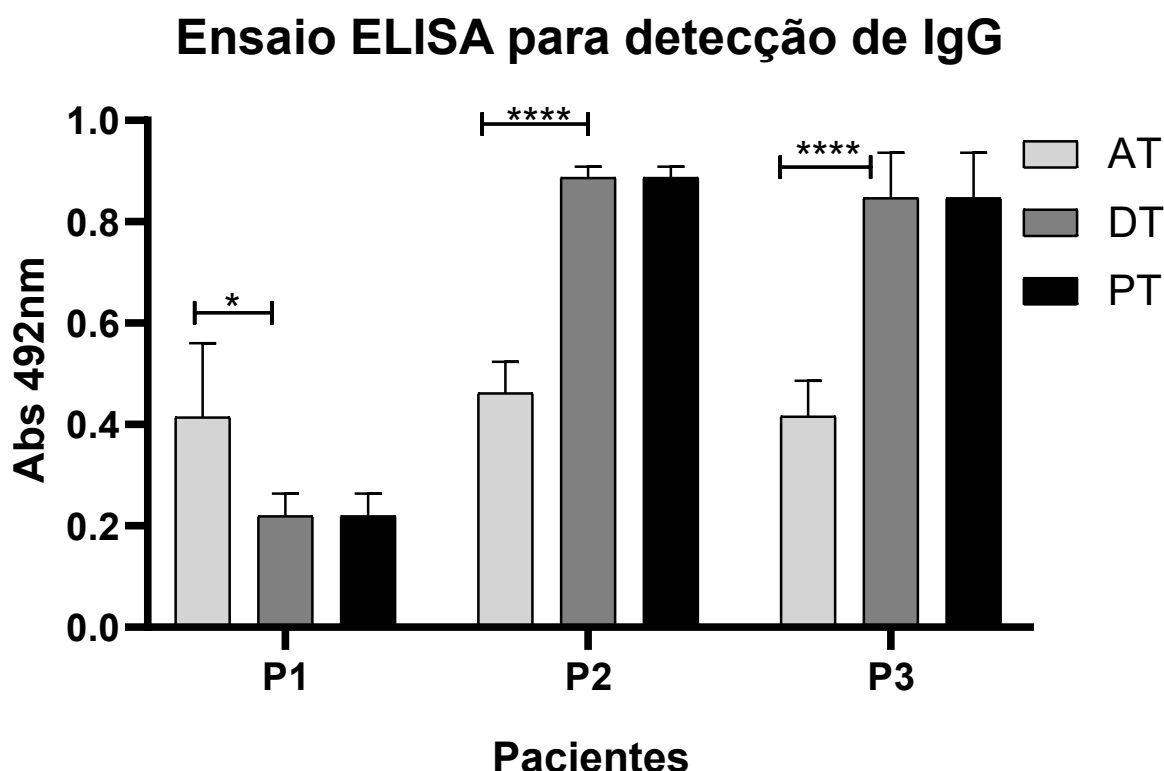
Fonte: Os autores.

Resposta à viroterapia

Produção de anticorpos IgG

Duas pacientes (P2 e P3) desenvolveram anticorpos circulantes IgG anti-La Sota no sangue dentro de 19 dias após a primeira infusão viral e esses anticorpos persistiram no 40º dia (Figura 3).

Figura 3 - Ensaio ELISA para a detecção de anticorpos IgG anti-cepas La Sota do vírus da doença de Newcastle em cadelas portadoras de neoplasias mamárias espontâneas tratadas com a cepa La Sota do VDN.



AT: antes do tratamento; DT: durante o tratamento; PT: posterior ao tratamento. Significância se $p < 0,05$; ns=não significativo.

Fonte: Os autores.

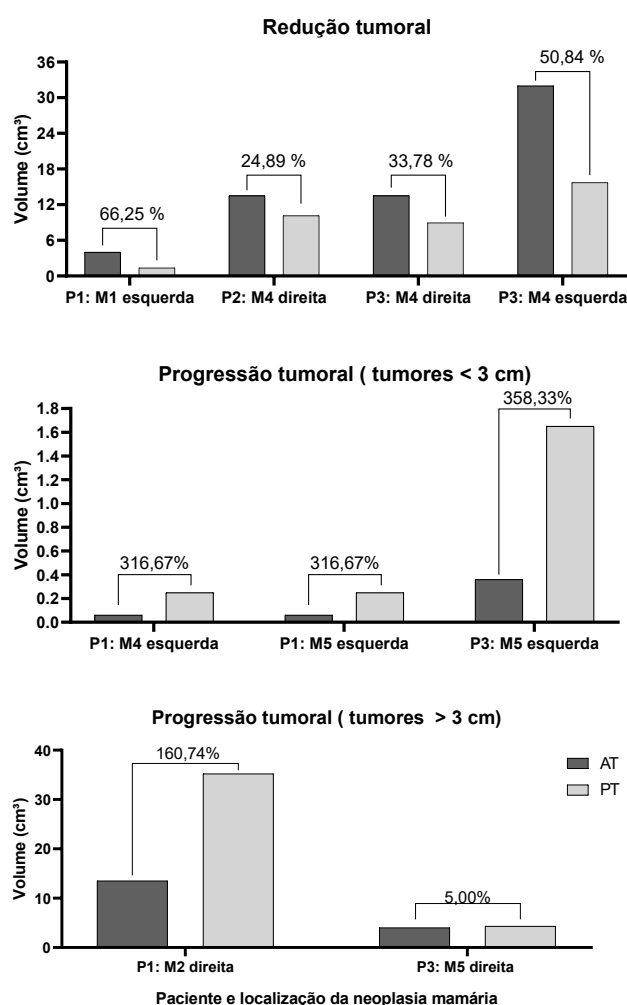
Nossos achados corroboram com estudo clínico anterior, em que Rossmeisl *et al.* (2024) investigaram a resposta imune de cães com tumores intracranianos após a administração de três infusões intravenosas da cepa rLAS-uPA do VDN. Estes autores evidenciaram anticorpos neutralizantes contra o vírus a partir do 14º dia pós-tratamento que todos os animais tratados. A persistência desses anticorpos foi observada ao longo do estudo. A presença contínua de anticorpos circulantes sugere uma resposta imune, possivelmente contribuindo para o controle viral e, consequentemente, impactando a progressão tumoral (Rossmeisl *et al.*, 2024).

Volume tumoral

Para classificar a taxa de resposta à viroterapia com a cepa La Sota do VDN, foram avaliados os parâmetros percentuais de redução ou progressão do volume tumoral. Além disso, foi considerada a detecção de novos focos tumorais, tanto locais quanto à distância e, para isso, as cadelas foram estadiadas de I a V no momento do diagnóstico inicial e reavaliadas ao final do acompanhamento.

Os volumes tumorais das neoplasias mamárias, antes e após o tratamento, estão apresentados na Figura 4.

Figura 4 - Volume tumoral antes e após o tratamento com a cepa La Sota do VDN, em cadelas com neoplasias mamárias espontâneas, para avaliação da redução e progressão tumoral.



M1: mama torácica cranial; M2: mama torácica caudal M3: mama abdominal cranial; M4: mama abdominal caudal; M5: mama inguinal AT: antes do tratamento; PT: posterior ao tratamento. Volumes tumorais e porcentagens referem-se a estatística descritiva.

Fonte: Os autores.

Estadiamento clínico

Quanto ao estadiamento, as pacientes 1 e 2 foram inicialmente classificadas em estágio II (Figura 2, A, D). No entanto, a paciente 2 foi reclassificada para estágio I (Figura 2, F) e a paciente 1 foi reclassificada para o estágio V (Figura 2, C), ao final do acompanhamento. O estadiamento da paciente 3 não foi possível devido falta de informação do *status* do linfonodo.

Classificação da resposta à terapia

Das três pacientes avaliadas, uma (33,3%) foi classificada com doença estável (DE), enquanto duas (66,7 %) apresentaram doença progressiva (DP).

Com base nos critérios estabelecidos, a paciente 2 apresentou uma doença estável (DE), visto que houve uma redução tumoral inferior a 50% (24,89%) na M4d sem evidências de progressão local ou metastática (Imagem 3, C). Já a paciente 3, apesar da redução de 50,84 % na neoplasia da M4e, compatível com resposta parcial (RP) e a redução de 33,78 % na M4d, compatível com doença estável (DE), a progressão de dois nódulos (M5d e M5e) a classificam com doença progressiva (DP). Rossmeisl *et al.* (2024) relataram que 66,67 % dos cães tratados com infusões intravenosas da cepa rLAS-uPA do VDN mantiveram a doença estável; apenas um cão apresentou progressão tumoral durante o estudo e 22,22 % apresentaram resposta parcial ao tratamento. No entanto, a titulação de IgG aumentada durante e após o tratamento, em ambas as pacientes, indica uma ativação do sistema imune em resposta à infecção viral induzida pela cepa La Sota do NDV. Esse achado é relevante, pois sugere que o vírus pode ter promovido uma resposta imune persistente, possivelmente favorecendo o reconhecimento e ataque às células tumorais (Rossmeisl *et al.*, 2024).

A paciente 2 foi acompanhada por 223 dias e, até o momento do fechamento desse artigo, dia 240, não foi classificada com doença progressiva. A estabilização da doença na paciente sugere que o tratamento pode ter contribuído para controlar o crescimento do tumor, mesmo na ausência de resposta objetiva significativa (ROSSMEISL *et al.*, 2024).

A paciente 3 não foi submetida a procedimento cirúrgico e a falta das análises histopatológicas das neoplasias, bem como a ausência do *status* do linfonodo, comprometeram a completa avaliação da taxa de resposta da paciente, que foi acompanhada por 204 dias. A mastectomia é a principal abordagem terapêutica para TMCs, proporcionando a remoção eficaz do tumor e reduzindo o risco de metástases para linfonodos satélites e órgãos distantes. Além de contribuir para o controle da progressão da doença, a intervenção cirúrgica melhora a qualidade de vida ao minimizar sintomas como dor, inflamação e infecções secundárias. Ademais, permite a análise histopatológica da lesão, fornecendo informações essenciais para o

prognóstico. A intervenção cirúrgica, portanto, representa a estratégia mais eficaz para aumentar a sobrevida e o sucesso terapêutico em cadelas acometidas por tumores mamários (CASSALI et al., 2020)

Em relação à paciente 1, a queda significativa na titulação de IgG durante o tratamento, persistindo até o 40º dia (Figura 3), sugere um possível efeito imunomodulador da cepa La Sota do VDN. De acordo com Zamarin e Palese (2012), esse vírus pode exercer tanto efeitos estimulantes quanto supressores sobre o sistema imune, a depender do estado fisiológico do hospedeiro e das condições do microambiente tumoral. No momento do diagnóstico, a paciente já apresentava leucopenia com eosinopenia e monocitopenia, indicando um provável comprometimento imunológico pré-existente, possivelmente associado à própria neoplasia (Oliveira *et al.*, 2022). Esse cenário pode ter limitado a resposta antiviral e antitumoral após a viroterapia. Apesar da intervenção, houve progressão para metástase pulmonar com efusão pleural, culminando no óbito. Embora o VDN não tenha impedido a disseminação tumoral nesse caso, a sobrevida de 250 dias pode representar um ganho clínico quando comparada à média relatada para cadelas com tumores metastáticos sem acesso à viroterapia (Silva Soares *et al.*, 2023), sugerindo um possível efeito paliativo.

Conclusões

A cepa La Sota do VDN foi capaz de induzir a lise das células tumorais CMT-U27 *in vitro*, sem causar toxicidade às células normais. Entretanto, quando utilizada como tratamento neoadjuvante de carcinomas mamários espontâneos em cadelas, demonstrou respostas heterogêneas entre as pacientes, reforçando a complexidade da interação entre o vírus e o microambiente tumoral.

A produção de anticorpos IgG anti-cepa La Sota do vírus da doença de Newcastle indica que o VDN é capaz de estimular a resposta imune e pode representar uma alternativa terapêutica viável para cães com neoplasias mamárias.

A necessidade de protocolos mais robustos e bem estruturados e a ampliação do número de animais testados torna-se evidente, incluindo a padronização de esquemas terapêuticos, visando potencializar a resposta imunológica e superar mecanismos de resistência tumoral.

Financiamento

Esta pesquisa foi realizada com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e financiada por Rede Mineira de Pesquisa Translacional em Imunobiológicos e Biofármacos no Câncer (REMITRIBIC, RED-00031-21), Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia (INCT-TeraNano), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq Grant nº 403193/2022-2) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG Grant 01/2021 - DEMANDA UNIVERSAL APQ-02551-21; FAPEMIG Grant PPM nº00758-16 and FAPEMIG Grant nºCBB-APQ-03613-17).

Declaração do Conselho de Revisão Institucional

O estudo foi conduzido de acordo com as diretrizes da Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia, protocolo nº 23117.066601/2023-78, 19 de abril de 2024.

Declaração de Disponibilidade de Dados

As contribuições originais apresentadas neste estudo estão incluídas no artigo/material suplementar. Outras perguntas podem ser direcionadas ao(s) autor(es) correspondente(s).

Agradecimentos

Os pesquisadores agradecem à Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEV), Laboratório de Nanobiotecnologia Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart (NANOS), Laboratório de Doenças Infectocontagiosas (LADOC) e Laboratório de Incubação de Aves (LIAVE), todos localizados em Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

Conflitos de Interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

ABADIE, J. *et al.* Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer.

Part 2: immunophenotypes and prognostic significance. **Breast Cancer Research and**

Treatment, [s. l.], v. 167, n. 2, p. 459, 2017. ISSN: 15737217. DOI:

<https://doi.org/10.1007/S10549-017-4542-8>. Disponível em:

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5790838/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

ABD-AZIZ, N.; STANBRIDGE, E. J.; SHAFEE, N. Newcastle Disease virus degrades HIF-

1 α through proteasomal pathways independent of VHL and p53. **Journal of General**

Virology, [s. l.], v. 97, n. 12, p. 3174–3182, 2016. ISSN: 0022-1317. DOI:

<https://doi.org/https://doi.org/10.1099/jgv.0.000623>. Disponível em:

<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.000623>.

ADELFINGER, M. *et al.* Evaluation of a new recombinant oncolytic vaccinia virus strain

GLV-5b451 for feline mammary carcinoma therapy. **PloS one**, [s. l.], v. 9, n. 8, 2014. ISSN:

1932-6203. DOI: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0104337>. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25093734/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

AFT, R. L.; ZHANG, F. W.; GIUS, D. Evaluation of 2-deoxy-D-glucose as a

chemotherapeutic agent: mechanism of cell death. **British Journal of Cancer**, [s. l.], v. 87, n.

7, p. 805–812, 2002. ISSN: 0007-0920. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600547>.

Disponível em: <http://www.nature.com/articles/6600547>.

AGHI, M.; MARTUZA, R. L. Oncolytic viral therapies – the clinical experience. **Oncogene**

2005 24:52, [s. l.], v. 24, n. 52, p. 7802–7816, 2005. ISSN: 1476-5594. DOI:

<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209037>. Disponível em:

<https://www.nature.com/articles/1209037>. Acesso em: 12 jan. 2025.

AHMAD, U. *et al.* Inhibitory and Apoptosis-Inducing Effects of Newcastle Disease Virus

Strain AF2240 on Mammary Carcinoma Cell Line. **BioMed Research International**, [s. l.],

2015. ISSN: 2314-6133. DOI: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1155/2015/127828>.

Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/127828/>.

AHMED, I. *et al.* Induction of Nitric Oxide and TNF- α in Newcastle Disease Virus (NDV) AF2240 Infected RAW 264.7 Macrophages and their Cytotoxic Activity on MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Line. **Journal of Cancer Science & Therapy**, [s. l.], v. 06, n. 11, 2014. ISSN: 19485956. DOI: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4172/1948-5956.1000311>. Disponível em: <https://www.omicsonline.org/open-access/induction-of-nitric-oxide-and-tnf-in-newcastle-disease-virus-ndv-af-infected-raw-macrophages-1948-5956.1000311.php?aid=33952>.

ALABSI, A. M. *et al.* Anti-leukemic activity of Newcastle Disease virus strains AF2240 and V4-UPM in murine myelomonocytic leukemia in vivo. **Leukemia Research**, [s. l.], v. 36, n. 5, p. 634–645, 2012. ISSN: 01452126. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.leukres.2011.11.001>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0145212611005339>.

ALBERTS, P. *et al.* Long-term treatment with the oncolytic ECHO-7 virus Rigvir of a melanoma stage IV M1c patient, a small cell lung cancer stage IIIA patient, and a histiocytic sarcoma stage IV patient-three case reports. **APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, [s. l.], v. 124, n. 10, p. 896–904, 2016. ISSN: 1600-0463. DOI: <https://doi.org/10.1111/APM.12576>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27457663/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

ALCAYAGA-MIRANDA, F. *et al.* Osteosarcoma cells as carriers to allow antitumor activity of canine oncolytic adenovirus in the presence of neutralizing antibodies. **Cancer gene therapy**, [s. l.], v. 17, n. 11, p. 792–802, 2010. ISSN: 1476-5500. DOI: <https://doi.org/10.1038/CGT.2010.36>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20671769/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

ALEXANDER, D. J. Newcastle Disease in the European Union 2000 to 2009. **Avian Pathology**, [s. l.], v. 40, n. 6, p. 547–558, 2011. ISSN: 0307-9457. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/03079457.2011.618823>. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03079457.2011.618823>.

ALI, R. *et al.* Cytolytic effects and apoptosis induction of Newcastle Disease virus strain AF2240 on anaplastic astrocytoma brain tumor cell line. **Neurochemical Research**, [s. l.], v.

36, n. 11, p. 2051–2062, 2011. ISSN: 0364-3190. DOI:
<https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11064-011-0529-8>. Disponível em:
<http://link.springer.com/10.1007/s11064-011-0529-8>.

ALLEN, S. W.; PRASSE, K. W.; MAHAFFEY, E. A. Cytologic differentiation of benign from malignant canine mammary tumors. **Veterinary pathology**, [s. l.], v. 23, n. 6, p. 649–655, 1986. ISSN: 03009858. DOI:
<https://doi.org/https://doi.org/10.1177/030098588602300601>. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3811129/>.

AL-SHAMMARI, A. M. *et al.* 2-Deoxyglucose and Newcastle Disease Virus Synergize to Kill Breast Cancer Cells by Inhibition of Glycolysis Pathway Through Glyceraldehyde3-Phosphate Downregulation. **Frontiers in Molecular Biosciences**, [s. l.], v. 6, n. 90, p. 1–13, 2019. ISSN: 2296-889X. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00090>. Disponível em:
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmolb.2019.00090/full>.

AL-SHAMMARI, A. M. *et al.* Newcastle disease virus suppresses angiogenesis in mammary adenocarcinoma models. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, [s. l.], 2020. ISSN: 1311-1477. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.15547/BJVM.2020-0019>. Disponível em:
https://www.researchgate.net/publication/341984753_Newcastle_disease_virus_suppresses_angiogenesis_in_mammary_adenocarcinoma_models.

AL-ZIAYDI, A. G. *et al.* Hexokinase inhibition using D-Mannoheptulose enhances oncolytic Newcastle disease virus-mediated killing of breast cancer cells. **Cancer Cell International**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 1–10, 2020. ISSN: 14752867. DOI:
<https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s12935-020-01514-2>. Disponível em:
<https://doi.org/10.1186/s12935-020-01514-2>.

AMIN, Z. M. *et al.* Evaluation of a recombinant Newcastle Disease virus expressing human IL12 against human breast cancer. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 13999, 2019. ISSN: 2045-2322. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41598-019-50222-z>. Disponível em:
<http://www.nature.com/articles/s41598-019-50222-z>.

ANDRADE BRAGA, V. *et al.* Emotional Stress and Cardiovascular Complications in Animal Models: A Review of the Influence of Stress Type. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 7, p. 251, 2016. ISSN: 1664042X. DOI: <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2016.00251>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4919347/>. Acesso em: 7 fev. 2025.

ASSAYAGHI, R. M.; ALABSI, A. M.; ALI, A. M. Apoptosis induction of Newcastle Disease virus strains (AF 2240 & V4-UPM) on HT-29 Human colorectal adenocarcinoma cells. **JCRTO**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 1–5, 2016. ISSN: 23322403. DOI: <https://doi.org/10.17303/jcrto.2016.101>. Disponível em: <http://www.jscholaronline.org/full-text/JCRTO/5:101/Apoptosis-Induction-of-Newcastle-Disease-Virus-Strains.php>.

BAI, Y. *et al.* Newcastle Disease virus enhances the growth-inhibiting and proapoptotic effects of temozolomide on glioblastoma cells in vitro and in vivo. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, 2018. ISSN: 2045-2322. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41598-018-29929-y>. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-29929-y>.

BANDINELLI, M. B. *et al.* Ophthalmopathologic characterization of multicentric or metastatic neoplasms with an extraocular origin in dogs and cats. **Veterinary ophthalmology**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 814–827, 2020. ISSN: 1463-5224. DOI: <https://doi.org/10.1111/VOP.12803>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32687655/>. Acesso em: 8 fev. 2025.

BELL, J.; MCFADDEN, G. Viruses for Tumor Therapy. **Cell host & microbe**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 260, 2014. ISSN: 19346069. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2014.01.002>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3963258/>. Acesso em: 7 jan. 2025.

BIERMAN, H. R. *et al.* Remissions in leukemia of childhood following acute infectious disease: staphylococcus and streptococcus, varicella, and feline panleukopenias. **Cancer**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 591–605, 1953. ISSN: 10970142. DOI: [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1097-0142\(195305\)6:3<591::AID-CNCR2820060317>3.0.CO;2-M](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1097-0142(195305)6:3<591::AID-CNCR2820060317>3.0.CO;2-M). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13042782/>.

BILGIÇ, B.; DOKUZEYLÜL, B.; OR, M. E. Oncolytic virotherapy and the current approaches in veterinary medicine. **German Journal of Veterinary Research**, [s. l.], v. 2, n.

2, p. 17–27, 2022. ISSN: 27031322. DOI: <https://doi.org/10.51585/GJVR.2022.2.0032>.
Acesso em: 15 jan. 2025.

BINDEA, G. *et al.* Natural immunity to cancer in humans. **Current Opinion in Immunology**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 215–222, 2010. ISSN: 09527915. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.02.006>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952791510000385>.

BLUMING, AvrumZ.; ZIEGLER, JohnL. Regression of Burkitt's lymphoma in association with measles infection. **The Lancet**, [s. l.], v. 298, n. 7715, p. 105–106, 1971. ISSN: 01406736. DOI: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(71\)92086-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(71)92086-1). Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673671920861>.

BOMMAREDDY, P. K.; SHETTIGAR, M.; KAUFMAN, H. L. Integrating oncolytic viruses in combination cancer immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 18, n. 8, p. 498–513, 2018. ISSN: 1474-1733. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41577-018-0014-6>. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41577-018-0014-6>.

BRAY BSC, F. *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 74, n. 3, p. 229–263, 2024. ISSN: 1542-4863. DOI: <https://doi.org/10.3322/CAAC.21834>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21834>. Acesso em: 7 jan. 2025.

BURKE, S. *et al.* Oncolytic Newcastle disease virus activation of the innate immune response and priming of antitumor adaptive responses in vitro. **Cancer immunology, immunotherapy : CII**, [s. l.], v. 69, n. 6, p. 1015–1027, 2020. ISSN: 1432-0851. DOI: <https://doi.org/10.1007/S00262-020-02495-X>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32088771/>. Acesso em: 8 jan. 2025.

BURMAN, B.; PESCI, G.; ZAMARIN, D. Newcastle Disease virus at the forefront of cancer immunotherapy. **Cancers**, [s. l.], v. 12, 2020. ISSN: 2072-6694. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/cancers12123552>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/12/3552>.

CASSALI, G. D. *et al.* Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*.

http://www.abpv.vet.br/upload/documentos/DOWNLOAD-FULL-ARTICLE-29-20881_2011_7_11_14_42.pdf, [s. l.], 2011. ISSN: 1983-0246. Disponível em: <https://repositorio.ufba.br/handle/ri/5386>. Acesso em: 12 jan. 2025.

CASSALI, G. D. *et al.* **Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors-2013** *Braz J Vet Pathol*. [S. l.: s. n.], . Disponível em: www.bjvp.org.br.

CASSALI, G. D. *et al.* Consensus on the diagnosis, prognosis, and treatment of canine and feline mammary tumors: solid arrangement – 2023. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 152–163, 2024. ISSN: 19830246. DOI: <https://doi.org/10.24070/BJVP.1983-0246.V17I3P152-163>. Disponível em: <https://bjvp.org.br/v-17-n-3-28/>. Acesso em: 12 jan. 2025.

CASSALI, G. D. *et al.* Consensus Regarding the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine and Feline Mammary Tumors – 2019. **Braz. j. vet. pathol**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 555–574, 2020. ISSN: 19830246. DOI: <https://doi.org/10.24070/BJVP.1983-0246.V13I3P555-574>. Disponível em: <https://bjvp.org.br/wp-content/uploads/2020/11/v13-n3-1.pdf>. Acesso em: 13 jan. 2025.

CASSALI, G. *et al.* Consensus Regarding the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine and Feline Mammary Tumors - 2019. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 555–574, 2020. ISSN: 19830246. DOI: <https://doi.org/10.24070/bjvp.1983-0246.v13i3p555-574>. Disponível em: <http://bjvp.org.br/wp-content/uploads/2020/11/v13-n3-1.pdf>.

CASSALI, G. D. *et al.* Consensus regarding the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors: benign mixed tumors, carcinomas in mixed tumors and carcinosarcomas. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 87–99, 2017. ISSN: 19830246. DOI: <https://doi.org/10.24070/BJVP.1983-0246.V10I3P87-99>. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/002865861>. Acesso em: 13 jan. 2025.

CASSALI, G. D.; NAKAGAKI, K. Y. R. Anatomopatologia do tumor primário e linfonodos. *In: Patologia mamária canina e felina: do diagnóstico ao tratamento*. 2. ed., São Paulo: MedVet, 2023 a.

CASSALI, G. D.; NAKAGAKI, K. Y. R. Aspectos epidemiológicos das neoplasias mamárias em cadelas e gatas. . *In: Patologia mamária canina e felina: do diagnóstico ao tratamento*. 2. ed., São Paulo: MedVet, 2023 b. p. 43–55.

CASSALI, G. D.; NAKAGAKI, K. Y. R. Citopatologia mamária: técnicas de amostragem, interpretação e correlação cito-histológica. *In: Patologia mamária canina e felina: do diagnóstico ao tratamento*. 2. ed., São Paulo: MedVet, 2023 c. p. 65–94.

CASSEL, W. A.; GARRETT, R. E. Newcastle disease virus as an antineoplastic agent. **Cancer**, [s. l.], v. 18, n. 7, p. 863–868, 1965. ISSN: 0008-543X. DOI: [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1097-0142\(196507\)18:7<863::AID-CNCR2820180714>3.0.CO;2-V](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1097-0142(196507)18:7<863::AID-CNCR2820180714>3.0.CO;2-V). Disponível em: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142\(196507\)18:7%3C863::AID-CNCR2820180714%3E3.0.CO;2-V](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142(196507)18:7%3C863::AID-CNCR2820180714%3E3.0.CO;2-V).

CASSEL, W. A.; GARRETT, R. E. Tumor immunity after viral oncolysis. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 92, n. 3, 1966. ISSN: 0021-9193. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/JB.92.3.792-.1966>. Disponível em: <https://jlb.asm.org/content/92/3/792>.

CEJALVO, T. *et al.* Remission of Spontaneous Canine Tumors after Systemic Cellular Viroimmunotherapy. **Cancer Research**, [s. l.], v. 78, n. 17, p. 4891–4901, 2018. ISSN: 0008-5472. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-3754>. Disponível em: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-17-3754>.

CEKANOVA, M.; RATHORE, K. Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations. **Drug Design, Development and Therapy**, [s. l.], v. 8, p. 1911–1921, 2014. ISSN: 1177-8881. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.2147/DDDT.S49584>. Disponível em:

<http://www.dovepress.com/animal-models-and-therapeutic-molecular-targets-of-cancer-utility-and-peer-reviewed-article-DDDT>.

CHAMBERS, P. *et al.* Molecular cloning of complementary DNA to Newcastle Disease virus, and nucleotide sequence analysis of the junction between the genes encoding the Haemagglutinin-Neuraminidase and the large protein. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 67, n. 3, p. 475–486, 1986. ISSN: 0022-1317. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/0022-1317-67-3-475>. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-67-3-475>.

CH'NG, W. C. *et al.* Human renal carcinoma cells respond to Newcastle Disease virus infection through activation of the p38 MAPK/NF- κ B/I κ B α pathway. **Cellular Oncology**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 279–288, 2015. ISSN: 2211-3428. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s13402-015-0229-5>. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s13402-015-0229-5>.

COLETO, A. F.; FONSECA, B. B.; MEDEIROS-RONCHI, A. A. **Application of Newcastle Disease Virus in the Treatment of Human and Canine Mammary Cancer. Pakistan Veterinary Journal** 2024. (3) ISSN: 20747764. DOI: <https://doi.org/10.29261/pakvetj/2024.241>.

CSATARY, L. K. Viruses in the treatment of cancer. **The Lancet**, [s. l.], v. 298, n. 7728, 1971. ISSN: 01406736. DOI: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(71\)92788-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(71)92788-7). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4106650/>.

CUADRADO-CASTANO, S. *et al.* Enhancement of the proapoptotic properties of Newcastle Disease virus promotes tumor remission in syngeneic murine cancer models. **Molecular Cancer Therapeutics**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 1247–1258, 2015 a. ISSN: 1535-7163. DOI: <https://doi.org/http://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0913>. Disponível em: <http://mct.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1535-7163.MCT-14-0913>.

CUADRADO-CASTANO, S. *et al.* The therapeutic effect of death: Newcastle disease virus and its antitumor potential. **Virus research**, [s. l.], v. 209, p. 56, 2015 b. ISSN: 18727492.

DOI: <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2015.07.001>. Disponível em:
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4630136/>. Acesso em: 9 jan. 2025.

CZEGLÉDI, A. *et al.* Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. **Virus Research**, [s. l.], v. 120, n. 1–2, p. 36–48, 2006. ISSN: 01681702. DOI:
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.11.009>. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168170205003485>.

DAS, A. *et al.* Therapeutic potential of ndv-2k17 strain in canine mammary gland tumor. **International Journal of Chemical Studies**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 605–609, 2017. ISSN: 2349–8528. Disponível em: <https://www.chemijournal.com/archives/2017/vol5issue4/PartJ/5-3-168-620.pdf>.

DIAS, J. N. R. Diagnóstico imagiológico de metastização pulmonar : radiografia versus tomografia computadorizada. [s. l.], 2012. Disponível em:
<https://repositorio.ulisboa.pt/handle/10400.5/3986>. Acesso em: 1 fev. 2025.

DIMITROV, K. M. *et al.* Temporal, geographic, and host distribution of avian paramyxovirus 1 (Newcastle disease virus). **Infection, Genetics and Evolution**, [s. l.], v. 39, p. 22–34, 2016. ISSN: 15671348. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.01.008>.
Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134816300089>.

DIMITROV, K. M. *et al.* Updated unified phylogenetic classification system and revised nomenclature for Newcastle disease virus. **Infection, Genetics and Evolution**, [s. l.], v. 74, p. 103917, 2019. ISSN: 15677257. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2019.103917>.
Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6876278/>. Acesso em: 9 jan. 2025.

DORTMANS, J. C. *et al.* Virulence of Newcastle Disease virus: what is known so far? **Veterinary Research**, [s. l.], v. 42, n. 1, 2011. ISSN: 1297-9716. DOI:
<https://doi.org/https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-122>. Disponível em:
<http://www.veterinaryresearch.org/content/42/1/122>.

DUBOIS, E. *et al.* Intra-laboratory validation of a concentration method adapted for the enumeration of infectious F-specific RNA coliphage, enterovirus, and hepatitis A virus from inoculated leaves of salad vegetables. **International journal of food microbiology**, [s. l.], v. 108, n. 2, p. 164–171, 2006. ISSN: 0168-1605. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2005.11.007>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16387377/>. Acesso em: 5 fev. 2025.

DUFFY, M. R.; FISHER, K. D.; SEYMOUR, L. W. Making Oncolytic Virotherapy a Clinical Reality: The European Contribution. **Human Gene Therapy**, [s. l.], v. 28, n. 11, p. 1033–1046, 2017. ISSN: 1043-0342. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1089/hum.2017.112>. Disponível em: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/hum.2017.112>.

ELANKUMARAN, S.; ROCKEMANN, D.; SAMAL, S. K. Newcastle Disease virus exerts oncolysis by both intrinsic and extrinsic caspase-dependent pathways of cell death. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 80, n. 15, p. 7522–7534, 2006. ISSN: 0022-538X. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/JVI.00241-06>. Disponível em: <https://jvi.asm.org/content/80/15/7522>.

EL-SAYED, A.; HARASHIMA, H. Endocytosis of Gene Delivery Vectors: From Clathrin-dependent to Lipid Raft-mediated Endocytosis. **Molecular Therapy**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 1118, 2013. ISSN: 15250024. DOI: <https://doi.org/10.1038/MT.2013.54>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3677298/>. Acesso em: 12 jan. 2025.

EMA. **Imlygic. Talimogene Laherparepvec**. 2016. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/imlygic>.

FAN, X. *et al.* Overexpression of p53 delivered using recombinant NDV induces apoptosis in glioma cells by regulating the apoptotic signaling pathway. **Experimental and Therapeutic Medicine**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 4522–4530, 2018. ISSN: 1792-0981. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.3892/etm.2018.5935>; Disponível em: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2018.5935>.

FELDMAN, E. R. *et al.* Phase II trial of recombinant tumor necrosis factor in disseminated malignant melanoma. **American journal of clinical oncology**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 256–259,

1992. ISSN: 0277-3732. DOI: <https://doi.org/10.1097/00000421-199206000-00015>.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1590281/>. Acesso em: 12 jan. 2025.

FERRONE, C.; DRANOFF, G. Dual roles for immunity in gastrointestinal cancers. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 28, n. 26, p. 4045–4051, 2010. ISSN: 0732-183X. DOI:

<https://doi.org/https://doi.org/10.1200/JCO.2010.27.9992>. Disponível em:

<http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2010.27.9992>.

FLANAGAN, A. D.; LOVE, R.; TESAR, W. Propagation of Newcastle Disease virus in Ehrlich ascites cells in vitro and in vivo. **Experimental Biology and Medicine**, [s. l.], v. 90, n. 1, p. 82–86, 1955. ISSN: 1535-3702. DOI:

<https://doi.org/https://doi.org/10.3181/00379727-90-21945>. Disponível em:

<http://ebm.sagepub.com/lookup/doi/10.3181/00379727-90-21945>.

FLEMING, J. M.; CREEVY, K. E.; PROMISLOW, D. E. L. Mortality in north american dogs from 1984 to 2004: an investigation into age-, size-, and breed-related causes of death.

Journal of Veterinary Internal Medicine, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 187–198, 2011. ISSN:

08916640. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.0695.x>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21352376/>.

FORD, R. B. .; MAZZAFERRO, Elisa. **Kirk & Bistner Manual de Procedimentos**

Veterinários e Tratamento Emergencial. 9. ed., [s. l.], : GEN Guanabara Koogan, 2013.

767 p. ISBN: 8535254358. Acesso em: 3 fev. 2025.

FOUNTZILAS, C.; PATEL, S.; MAHALINGAM, D. Review: oncolytic virotherapy, updates and future directions. **Oncotarget**, [s. l.], v. 8, n. 60, p. 617–639, 2017. ISSN: 1949-2553.

DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.18632/oncotarget.18309>. Disponível em:

<https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.18309>.

FRAMPTON, J. E. Teserpaturev/G47Δ: First Approval. **BioDrugs**, [s. l.], v. 36, n. 5, p. 667–672, 2022. ISSN: 1179190X. DOI: <https://doi.org/10.1007/S40259-022-00553-7>/METRICS.

Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40259-022-00553-7>. Acesso em: 6 jan. 2025.

FREEMAN, A. I. *et al.* Phase I/II trial of intravenous NDV-HUJ oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme. **Molecular Therapy**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 221–228, 2006. ISSN: 15250016. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.08.016>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1525001605015704>.

FUERTES, M. B. *et al.* Host type I IFN signals are required for antitumor CD8⁺ T cell responses through CD8 α ⁺ dendritic cells. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 208, n. 10, p. 2005–2016, 2011. ISSN: 1540-9538. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1084/jem.20101159>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3182064/>.

FULBER, J. P. C.; KAMEN, A. A. Development and Scalable Production of Newcastle Disease Virus-Vectored Vaccines for Human and Veterinary Use. **Viruses**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 975, 2022. ISSN: 19994915. DOI: <https://doi.org/10.3390/V14050975>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9143368/>. Acesso em: 12 jan. 2025.

FÜRDÖS, I. *et al.* Translating clinical trials from human to veterinary oncology and back. **Journal of Translational Medicine**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 265, 2015. ISSN: 14795876. ISBN: 1296701506319. DOI: <https://doi.org/10.1186/S12967-015-0631-9>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4536666/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

GANAR, K. *et al.* Newcastle disease virus: Current status and our understanding. **Virus Research**, [s. l.], v. 184, p. 71–81, 2014. ISSN: 01681702. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.02.016>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016817021400080X>.

GARBER, K. China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment. **Journal of the National Cancer Institute**, [s. l.], v. 98, n. 5, p. 298–300, 2006. ISSN: 14602105. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/jnci/djj111>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16507823/>.

GATTINO, F. *et al.* PDGFR- α , PDGFR- β , VEGFR-2 and CD117 expression in canine mammary tumours and evaluation of the in vitro effects of toceranib phosphate in neoplastic mammary cell lines. **The Veterinary record**, [s. l.], v. 183, n. 7, p. 221, 2018. ISSN: 2042-

7670. DOI: <https://doi.org/10.1136/VR.104414>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29440590/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

GE, J. *et al.* Newcastle Disease Virus-Vectored Rabies Vaccine Is Safe, Highly Immunogenic, and Provides Long-Lasting Protection in Dogs and Cats. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 85, n. 16, p. 8241, 2011. ISSN: 0022-538X. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00519-11>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3147977/>. Acesso em: 12 jan. 2025.

GE, J. *et al.* Recombinant Newcastle disease viral vector expressing hemagglutinin or fusion of canine distemper virus is safe and immunogenic in minks. **Vaccine**, [s. l.], v. 33, n. 21, p. 2457–2462, 2015. ISSN: 1873-2518. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2015.03.091>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25865465/>. Acesso em: 12 jan. 2025.

GENTSCHEV, I. *et al.* Characterization and evaluation of a new oncolytic Vaccinia Virus strain LIVP6.1.1 for canine cancer therapy. **Bioengineered**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 84, 2013. ISSN: 19491026. DOI: <https://doi.org/10.4161/BIOE.22462>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3609626/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

GENTSCHEV, I. *et al.* Preclinical Evaluation of Oncolytic Vaccinia Virus for Therapy of Canine Soft Tissue Sarcoma. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. e37239, 2012. ISSN: 19326203. DOI: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0037239>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3352892/>. Acesso em: 14 jan. 2025.

GENTSCHEV, I. *et al.* Use of an oncolytic vaccinia virus for the treatment of canine breast cancer in nude mice: preclinical development of a therapeutic agent. **Cancer gene therapy**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 320–328, 2009. ISSN: 1476-5500. DOI: <https://doi.org/10.1038/CGT.2008.87>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18949014/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

GHRICI, M. *et al.* Induction of apoptosis in MCF-7 cells by the Hemagglutinin-Neuraminidase glycoprotein of Newcastle Disease virus malaysian strain AF2240. **Oncology Reports**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 1035–1044, 2013 a. ISSN: 1021-335X. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.3892/or.2013.2573>. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2013.2573>.

GHRICI, M. *et al.* Newcastle disease virus Malaysian strain AF2240 induces apoptosis in MCF-7 human breast carcinoma cells at an early stage of the virus life cycle. **International Journal of Molecular Medicine**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 525–532, 2013 b. ISSN: 1107-3756. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1244>. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2013.1244>.

GLICKMAN, R. L. *et al.* Quantitative basic residue requirements in the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein as a determinant of virulence for Newcastle disease virus. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 62, n. 1, p. 354–356, 1988. ISSN: 0022-538X. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/jvi.62.1.354-356.1988>. Disponível em: <https://jvi.asm.org/content/62/1/354>.

GOLDSCHMIDT, M. H. *et al.* Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary pathology**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 117–131, 2011. ISSN: 1544-2217. DOI: <https://doi.org/10.1177/0300985810393258>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21266722/>. Acesso em: 12 jan. 2025.

GOLDSCHMIDT, M. H.; PEÑA, L.; ZAPPULLI, V. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D. J. (org.). **Tumors in Domestic Animals**. 5. ed., Raleigh, NC, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2017. p. 723–765. ISBN: 9781119181200. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119181200>.

GRAAF, J. F. *et al.* Determinants of the efficacy of viro-immunotherapy: a review. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, [s. l.], v. 56, p. 124–132, 2020. ISSN: 13596101. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2020.07.001>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359610120301477>.

GROSS, S. MEASLES AND LEUKÆMIA. **The Lancet**, [s. l.], v. 297, n. 7695, p. 397–398, 1971. ISSN: 01406736. DOI: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(71\)92232-x](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0140-6736(71)92232-x). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4100233/>.

GUJAR, S.; POL, J. G.; KROEMER, G. Heating it up: Oncolytic viruses make tumors “hot” and suitable for checkpoint blockade immunotherapies. **Oncoimmunology**, [s. l.], v. 7, n. 8,

2018. ISSN: 2162-4011. DOI: <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1442169>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30221036/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

GUO, T. *et al.* A recombinant Newcastle disease virus expressing MMP8 promotes oncolytic efficacy. **Chinese Chemical Letters**, [s. l.], v. 32, n. 12, p. 3962–3966, 2021. ISSN: 10018417. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.CCLET.2021.05.001>. Acesso em: 1 fev. 2025.

HANAHAHAN, D. **Hallmarks of Cancer: New Dimensions**. **Cancer Discovery** American Association for Cancer Research Inc., 2022. (1) ISSN: 21598290. DOI: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, [s. l.], v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. ISSN: 1097-4172. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.02.013>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21376230/>. Acesso em: 8 jan. 2025.

HANSEN, K.; KHANNA, C. Spontaneous and genetically engineered animal models: use in preclinical cancer drug development. **European Journal of Cancer**, [s. l.], v. 40, n. 6, p. 858–880, 2004. ISSN: 0959-8049. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejca.2003.11.031>. Disponível em: <http://www.ejcancer.com/article/S0959804904000498/fulltext>.

HASSAN, S. A. H.; ALLAWI, A. B.; AL-SHAMMARI, A. M. In Vitro Oncolytic activity of non-virulent Newcastle Disease Virus LaSota Strain against Mouse mammary adenocarcinoma. **Iraqi Journal of Science**, [s. l.], v. 61, n. 2, p. 285–294, 2020. ISSN: 2312-1637. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.24996/ijcs.2020.61.2.5>. Disponível em: <http://scbaghdad.edu.iq/eijs/index.php/eijs/article/view/1531>.

HASSAN, S. A. H.; AL-SHAMMARI, A. M.; ALLAWI, A. B. Oncolytic effect of non-virulent Newcastle Disease virus LaSota strain in human breast cancer cell lines in vitro. **Biochemical and Cellular Archives**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 1013–1022, 2020. ISSN: 09761772. DOI: <https://doi.org/10.35124/bca.2020.20.1.1013>. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/343240554_Oncolytic_effect_of_non-

virulent_Newcastle_disease_virus_lasota_strain_in_human_breast_cancer_cell_lines_in_vitro

HE, J. *et al.* Newcastle disease virus chimeras expressing the Hemagglutinin- Neuraminidase protein of mesogenic strain exhibits an enhanced anti-hepatoma efficacy. **Virus Research**, [s. l.], v. 221, p. 23–29, 2016. ISSN: 18727492. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.04.023>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27164362/>.

HEGDE, P. S.; KARANIKAS, V.; EVERS, S. The where, the when, and the how of immune monitoring for cancer immunotherapies in the era of checkpoint inhibition. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 22, n. 8, p. 1865–1874, 2016. ISSN: 1078-0432. DOI: <https://doi.org/https://scite.ai/reports/10.1158/1078-0432.ccr-15-1507>. Disponível em: <http://clincancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1078-0432.CCR-15-1507>.

HEMMINKI, O.; DOS SANTOS, J. M.; HEMMINKI, A. Oncolytic viruses for cancer immunotherapy. **Journal of Hematology & Oncology**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 84, 2020. ISSN: 17568722. DOI: <https://doi.org/10.1186/S13045-020-00922-1>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7325106/>. Acesso em: 7 jan. 2025.

HIRAYAMA, F. Current understanding of allergic transfusion reactions: incidence, pathogenesis, laboratory tests, prevention and treatment. **British journal of haematology**, [s. l.], v. 160, n. 4, p. 434–444, 2013. ISSN: 1365-2141. DOI: <https://doi.org/10.1111/BJH.12150>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23215650/>. Acesso em: 16 jan. 2025.

HORTA, R. dos S. *et al.* Influence of Surgical Technique on Overall Survival, Disease Free Interval and New Lesion Development Interval in Dogs with Mammary Tumors. **Advances in Breast Cancer Research**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 38–46, 2014. ISSN: 2168-1589. DOI: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4236/abcr.2014.32006>. Disponível em: <http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/abcr.2014.32006>.

HOTTE, S. J. *et al.* An optimized clinical regimen for the oncolytic virus PV701. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**,

[s. l.], v. 13, n. 3, p. 977–985, 2007. ISSN: 1078-0432. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1817>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17289893/>. Acesso em: 12 jan. 2025.

HU, L. *et al.* Targeting autophagy for oncolytic immunotherapy. **Biomedicines**, [s. l.], v. 5, n. 4, 2017. ISSN: 2227-9059. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/biomedicines5010005>. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2227-9059/5/1/5>.

HUNTER, T.; LLERA, R.; WARD, E. **Anemia in Dogs | VCA Animal Hospitals**. 2023. Disponível em: <https://vcahospitals.com/know-your-pet/anemia-in-dogs>. Acesso em: 8 fev. 2025.

HWANG, C. C. *et al.* Oncolytic reovirus in canine mast cell tumor. **PloS one**, [s. l.], v. 8, n. 9, 2013. ISSN: 1932-6203. DOI: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0073555>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24073198/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

ICTV. **Mononegavirales - Negative Sense RNA Viruses**. 2011. Disponível em: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/negative-sense-rna-viruses-2011/w/negrna_viruses/194/mononegavirales.

INSTITUTO BUTANTAN. **ButanVac não atinge desfecho esperado e Butantan interrompe seu desenvolvimento - Instituto Butantan**. 2024. Disponível em: <https://butantan.gov.br/noticias/butanvac-nao-atinge-desfecho-esperado-e-butantan-interrompe-seu-desenvolvimento>. Acesso em: 12 jan. 2025.

IORIO, R. M. *et al.* Structural and Functional Relationship between the Receptor Recognition and Neuraminidase Activities of the Newcastle Disease Virus Hemagglutinin-Neuraminidase Protein: Receptor Recognition Is Dependent on Neuraminidase Activity. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 75, n. 4, p. 1918, 2001. ISSN: 0022-538X. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.75.4.1918-1927.2001>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC115138/>. Acesso em: 12 jan. 2025.

JARAHIAN, M. *et al.* Activation of natural killer cells by newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase. **Journal of virology**, [s. l.], v. 83, n. 16, p. 8108–8121, 2009.

ISSN: 1098-5514. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00211-09>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19515783/>. Acesso em: 10 jan. 2025.

JAVANBAKHT, M. *et al.* Oncolytic viruses: a novel treatment strategy for breast cancer. **Genes & Diseases**, [s. l.], 2021. ISSN: 2352-3042. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gendis.2021.11.011>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352304221001616>.

Jl, Y. *et al.* Two single mutations in the fusion protein of Newcastle disease virus confer hemagglutinin-neuraminidase independent fusion promotion and attenuate the pathogenicity in chickens. **Virology**, [s. l.], v. 509, p. 146–151, 2017. ISSN: 00426822. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.06.021>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682217301976>.

JIN, K.-T. *et al.* Crosstalk between oncolytic viruses and autophagy in cancer therapy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 134, 2021. ISSN: 07533322. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110932>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332220311240>.

JOURDIER, T. M. *et al.* Local immunotherapy of spontaneous feline fibrosarcomas using recombinant poxviruses expressing interleukin 2 (IL2). **Gene therapy**, [s. l.], v. 10, n. 26, p. 2126–2132, 2003. ISSN: 0969-7128. DOI: <https://doi.org/10.1038/SJ.GT.3302124>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14625567/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

KALID, M. *et al.* Gene expression profiling in apoptotic MCF-7 cells infected with Newcastle Disease virus. **Global Veterinaria**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 334–340, 2010. ISSN: 1992-6197. Disponível em: [https://idosi.org/gv/gv5\(6\)10/7.pdf](https://idosi.org/gv/gv5(6)10/7.pdf).

KALYANASUNDRAM, J. *et al.* Newcastle Disease virus strain AF2240 as an oncolytic virus: a review. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 183, p. 126–133, 2018. ISSN: 0001706X. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.04.007>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X18301840>.

KAN, X. *et al.* Newcastle-disease-virus-induced ferroptosis through nutrient deprivation and ferritinophagy in tumor cells. **iScience**, [s. l.], v. 24, n. 8, 2021. ISSN: 2589-0042. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102837>.

KANAYA, N. *et al.* Anti-tumor effect of adenoviral vector-mediated p53 gene transfer on the growth of canine osteosarcoma xenografts in nude mice. **The Journal of veterinary medical science**, [s. l.], v. 73, n. 7, p. 877–883, 2011. ISSN: 1347-7439. DOI: <https://doi.org/10.1292/JVMS.10-0570>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21350316/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

KARAYANNOPOULOU, M. *et al.* Adjuvant post-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer. **Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine**, [s. l.], v. 48, n. 2, p. 85–96, 2001. ISSN: 0931-184X. DOI: <https://doi.org/10.1046/J.1439-0442.2001.00336.X>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11315572/>. Acesso em: 13 jan. 2025.

KEMP, V. *et al.* Developing oncolytic viruses for clinical use: a consortium approach. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, [s. l.], v. 56, p. 133–140, 2020. ISSN: 13596101. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2020.06.010>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359610120301453>.

KERKAR, S. P.; RESTIFO, N. P. **Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment. Cancer Research** 2012. (13) ISSN: 00085472. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-4094>.

KESHAVARZ, M. *et al.* Oncolytic Newcastle disease virus reduces growth of cervical cancer cell by inducing apoptosis. **Saudi journal of biological sciences**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 47–52, 2020. ISSN: 1319-562X. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2019.04.015>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31889816/>. Acesso em: 15 maio. 2022.

KIM, R.; EMI, M.; TANABE, K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. **Immunology**, [s. l.], v. 121, n. 1, p. 1–14, 2007. ISSN: 00192805. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2265921/>.

KING, J. N. **Phase I Clinical Trial of Recombinant Oncolytic Newcastle Disease Virus for Intracranial Meningioma**. 2017. Master of Science in Biomedical and Veterinary Sciences - Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, [s. l.], 2017.

KIUPEL, M. *et al.* Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. **Veterinary Pathology**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 147–155, 2011. ISSN: 15442217. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1177/0300985810386469>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21062911/>.

KOKS, C. A. *et al.* Newcastle disease virotherapy induces long-term survival and tumor-specific immune memory in orthotopic glioma through the induction of immunogenic cell death. **International Journal of Cancer**, [s. l.], v. 136, n. 5, p. 313–325, 2015. ISSN: 0020-7136. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ijc.29202>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.29202>.

KOL, A. *et al.* Companion animals: Translational scientist's new best friends. **Science translational medicine**, [s. l.], v. 7, n. 308, 2015. ISSN: 1946-6242. DOI: <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.AAA9116>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26446953/>. Acesso em: 4 fev. 2025.

KRZYSZCZYK, P. *et al.* The growing role of precision and personalized medicine for cancer treatment. **Technology**, [s. l.], v. 6, n. 3–4, p. 79, 2019. ISSN: 2339-5478. DOI: <https://doi.org/10.1142/S2339547818300020>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6352312/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

KWON, J. Y. *et al.* Canine as a Comparative and Translational Model for Human Mammary Tumor. **Journal of Breast Cancer**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 1, 2023. ISSN: 20929900. DOI: <https://doi.org/10.4048/JBC.2023.26.E4>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9981990/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

LAM, H. Y. *et al.* Safety and clinical usage of newcastle disease virus in cancer therapy. **Journal of biomedicine & biotechnology**, [s. l.], v. 2011, 2011. ISSN: 1110-7251. DOI:

<https://doi.org/10.1155/2011/718710>. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22131816/>. Acesso em: 12 jan. 2025.

LAMB, R. A.; PARKS, G. D. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: BN, F.; DM, K.; PM, H. (org.). **Fields Virology**. 5. ed., Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1449–1496. Disponível em: <https://www.scholars.northwestern.edu/en/publications/paramyxoviridae-the-viruses-and-their-replication-2>.

LAURIE, S. A. *et al.* A phase 1 clinical study of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, using two-step desensitization. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, [s. l.], v. 12, n. 8, p. 2555–2562, 2006. ISSN: 1078-0432. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2038>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16638865/>. Acesso em: 9 jan. 2025.

LE, L. P. *et al.* Infectivity enhancement for adenoviral transduction of canine osteosarcoma cells. **Gene therapy**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 389–399, 2006. ISSN: 0969-7128. DOI: <https://doi.org/10.1038/SJ.GT.3302674>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16292351/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

LEBLANC, A. K. *et al.* Veterinary Cooperative Oncology Group—Common Terminology Criteria for Adverse Events (VCOG-CTCAE v2) following investigational therapy in dogs and cats. **Veterinary and Comparative Oncology**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 311, 2021. ISSN: 14765829. DOI: <https://doi.org/10.1111/VCO.12677>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8248125/>. Acesso em: 3 fev. 2025.

LEEuw, O. S. *et al.* Virulence of Newcastle Disease virus is determined by the cleavage site of the fusion protein and by both the stem region and globular head of the Haemagglutinin–Neuraminidase protein. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 86, n. 6, p. 1759–1769, 2005. ISSN: 0022-1317. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/vir.0.80822-0>. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.80822-0>.

LI, J. *et al.* Mutated form of the Newcastle Disease virus Hemagglutinin–Neuraminidase interacts with the homologous fusion protein despite deficiencies in both receptor recognition

and fusion promotion. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 78, n. 10, p. 5299–5310, 2004. ISSN: 0022-538X. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/JVI.78.10.5299-5310.2004>. Disponível em: <https://jvi.asm.org/content/78/10/5299>.

LI, Y. *et al.* **Oncolytic virotherapy in hepato-bilio-pancreatic cancer: The key to breaking the log jam?** **Cancer Medicine** Blackwell Publishing Ltd, 2020. (9) ISSN: 20457634. DOI: <https://doi.org/10.1002/cam4.2949>.

LI, P. *et al.* Therapeutic effects of a fusogenic newcastle disease virus in treating head and neck cancer. **Head & Neck**, [s. l.], v. 33, n. 10, p. 1394–1399, 2011. ISSN: 10433074. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/hed.21609>. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/hed.21609>.

LIN, D.; SHEN, Y.; LIANG, T. **Oncolytic virotherapy: basic principles, recent advances and future directions.** **Signal Transduction and Targeted Therapy** Springer Nature, 2023. (1) ISSN: 20593635. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01407-6>.

LIU, L. Fields Virology, 6th Edition. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 59, n. 4, 2014. ISSN: 1058-4838. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/cid/ciu346>. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/ciu346>.

LIU, T. *et al.* Hemagglutinin–Neuraminidase and fusion genes are determinants of NDV thermostability. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 228, p. 53–60, 2019. ISSN: 03781135. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.11.013>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113518309076>.

LOHMUELLER, J.; FINN, O. J. Current modalities in cancer immunotherapy: immunomodulatory antibodies, CARs and vaccines. **Pharmacology & Therapeutics**, [s. l.], v. 178, p. 31–47, 2017. ISSN: 01637258. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.03.008>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725817300888>.

LONDON, C. A. Tyrosine kinase inhibitors in veterinary medicine. **Topics in companion animal medicine**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 106–112, 2009. ISSN: 1938-9736. DOI:

<https://doi.org/10.1053/J.TCAM.2009.02.002>. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19732728/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

LORENCE, R. M. *et al.* Complete Regression of Human Neuroblastoma Xenografts in Athymic Mice After Local Newcastle Disease Virus Therapy. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, [s. l.], v. 86, n. 16, p. 1228–1233, 1994. ISSN: 0027-8874. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/jnci/86.16.1228>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/86.16.1228>.

MACEWEN, E. G.; WITHROW, S. Tumors of the mammary gland. *In*: WITHROW, Stephen. J.; MACEWEN, E. G.; VAIL, David. M. (org.). **Small Animal Oncology**. 2. ed., Philadelphia: Saunders Company, 1996. p. 356–372. ISBN: 978-0721677552. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.1996.tb01425.x>.

MACNEILL, A. L. *et al.* Myxoma virus induces apoptosis in cultured feline carcinoma cells. **Research in veterinary science**, [s. l.], v. 93, n. 2, p. 1036–1038, 2012. ISSN: 1532-2661. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2011.10.016>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22100245/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

MARCONATO, L. *et al.* Adjuvant gemcitabine after surgical removal of aggressive malignant mammary tumours in dogs. **Veterinary and comparative oncology**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 90–101, 2008. ISSN: 1476-5829. DOI: <https://doi.org/10.1111/J.1476-5829.2007.00143.X>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19178668/>. Acesso em: 13 jan. 2025.

MARTINEZ, C. *et al.* Evaluation of red blood cell distribution width in dogs with various illnesses. **The Canadian Veterinary Journal**, [s. l.], v. 60, n. 9, p. 964, 2019. ISSN: 00085286. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6697020/>. Acesso em: 7 fev. 2025.

MARTINI, V. *et al.* Oncolytic virotherapy: new weapon for breast cancer treatment. **ecancermedicalscience**, [s. l.], v. 14, n. 1149, p. 1–19, 2020. ISSN: 17546605. ISBN: 0000000283427. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.3332/ecancer.2020.1149>. Disponível

em: <https://ecancer.org/en/journal/article/1149-oncolytic-virotherapy-new-weapon-for-breast-cancer-treatment>.

MATSUDA, T.; KARUBE, H.; ARUGA, A. A Comparative Safety Profile Assessment of Oncolytic Virus Therapy Based on Clinical Trials. **Therapeutic innovation & regulatory science**, [s. l.], v. 52, n. 4, p. 430–437, 2018. ISSN: 2168-4804. DOI: <https://doi.org/10.1177/2168479017738979>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29714547/>. Acesso em: 12 jan. 2025.

MEBATSION, T.; WEILAND, F.; CONZELMANN, K.-K. Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 73, n. 1, p. 242–250, 1999. ISSN: 1098-5514. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/JVI.73.1.242-250.1999>. Disponível em: <https://jvi.asm.org/content/73/1/242>.

MENDONÇA, D. A. *et al.* Risk of arrhythmias in dogs with structural heart disease. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 42, p. e07153, 2022. ISSN: 0100-736X. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-7153>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pvb/a/wbhVwgmDLGvz8Hj55gkdSHL/>. Acesso em: 26 abr. 2025.

MENG, G. *et al.* Fludarabine as an adjuvant improves Newcastle Disease virus-mediated antitumor immunity in hepatocellular carcinoma. **Molecular Therapy - Oncolytics**, [s. l.], v. 13, p. 22–34, 2019. ISSN: 23727705. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.omto.2019.03.004>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2372770519300348>.

MEYER, D. J.; HARVEY, J. W. **Veterinary laboratory medicine : interpretation & diagnosis**. 2. ed., Philadelphia: Saunders, 2004. 351 p. ISBN: 9780721689265. Acesso em: 19 fev. 2025.

MEYYAPPAN, N. **Oncolytic effect of Newcastle Disease virus on the MCF-7 and MDAMB-231 breast cancer cell lines**. 2003. 25 f. Degree of Master of Science - Universiti Putra Malaysia, [s. l.], 2003. Disponível em: <https://core.ac.uk/reader/43001050>.

MILLER, P. J.; DECANINI, E. L.; AFONSO, C. L. Newcastle Disease: evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. **Infection, Genetics and Evolution**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 26–35, 2010. ISSN: 15671348. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.09.012>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19800028/>.

MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. *In*: MEUTEN, D. J. (org.). **Tumors in Domestic Animals**. 4. ed., Iowa: Iowa State Press, 2002. p. 575–606. ISBN: 9780470376928. DOI: <https://doi.org/10.1002/9780470376928>.

MISDORP, W.; ELSE, R.; HELLMÉN, E. **Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat**. 2. ed., Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology and the World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology, 1999. 1–59 p.

MOLOUKI, A.; PEETERS, B. Rescue of recombinant Newcastle disease virus: current cloning strategies and RNA polymerase provision systems. **Archives of Virology**, [s. l.], v. 162, p. 1–12, 2017. ISSN: 03048608. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00705-016-3065-7>.

MONTOYA, M. *et al.* Life expectancy tables for dogs and cats derived from clinical data. **Frontiers in veterinary science**, [s. l.], v. 10, 2023. ISSN: 2297-1769. DOI: <https://doi.org/10.3389/FVETS.2023.1082102>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36896289/>. Acesso em: 4 fev. 2025.

MORRIS, J. S.; DOBSON, J. M.; BOSTOCK, D. E. Use of tamoxifen in the control of canine mammary neoplasia. **The Veterinary record**, [s. l.], v. 133, n. 22, p. 539–542, 1993. ISSN: 0042-4900. DOI: <https://doi.org/10.1136/VR.133.22.539>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8116156/>. Acesso em: 13 jan. 2025.

MORRISON, T. G. Structure and function of a paramyxovirus fusion protein. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, [s. l.], v. 1614, n. 1, p. 73–84, 2003. ISSN: 00052736. DOI: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(03\)00164-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0005-2736(03)00164-0). Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273603001640>.

MPEKRIS, F. *et al.* Normalizing tumor microenvironment with nanomedicine and metronomic therapy to improve immunotherapy. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 345, p. 190, 2022. ISSN: 18734995. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2022.03.008>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9168447/>. Acesso em: 13 jan. 2025.

MUSTAFA, Z. *et al.* Viability reduction and Rac1 gene downregulation of heterogeneous ex-vivo glioma acute slice infected by the oncolytic Newcastle Disease virus strain V4UPM. **BioMed Research International**, [s. l.], p. 1–8, 2013. ISSN: 2314-6133. DOI: <https://doi.org/10.1155/2013/248507>. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/248507/>.

NCI. **FDA approves T-VEC to treat metastatic melanoma - National Cancer Institute**. 2015. Disponível em: <https://www.cancer.gov/news-events/cancer-currents-blog/2015/t-vec-melanoma>.

NEJAD, A. S. M. *et al.* Oncolytic effects of Hitchner B1 strain of Newcastle Disease virus against cervical cancer cell proliferation is mediated by the increased expression of cytochrome C, autophagy and apoptotic pathways. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 147, p. 104438, 2020. ISSN: 08824010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104438>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401020308044>.

NELSON, N. J. Scientific interest in Newcastle Disease virus is reviving. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, [s. l.], v. 91, n. 20, p. 1708–1710, 1999. ISSN: 0027-8874. DOI: <https://doi.org/10.1093/jnci/91.20.1708>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/91.20.1708>.

NELSON, B. H. The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes. **Immunological Reviews**, [s. l.], v. 222, n. 1, p. 101–116, 2008. ISSN: 0105-2896. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00614.x>. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-065X.2008.00614.x>.

NIU, Z. *et al.* Recombinant newcastle disease virus expressing il15 demonstrates promising antitumor efficiency in melanoma model. **Technology in Cancer Research & Treatment**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 607–615, 2015. ISSN: 1533-0346. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.7785/tcrt.2012.500414>. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.7785/tcrt.2012.500414>.

NOSALOVA, N. *et al.* Canine Mammary Tumors: Classification, Biomarkers, Traditional and Personalized Therapies. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 25, n. 5, p. 2891, 2024. ISSN: 14220067. DOI: <https://doi.org/10.3390/IJMS25052891>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10931591/>. Acesso em: 12 jan. 2025.

NOVOSAD, C. A. Principles of treatment for mammary gland tumors. **Clinical techniques in small animal practice**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 107–109, 2003. ISSN: 1096-2867. DOI: <https://doi.org/10.1053/SVMS.2003.36625>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12831071/>. Acesso em: 13 jan. 2025.

NPS. **Talimogene laherparepvec**. 2017. ISSN: 03128008. DOI: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.18773/austprescr.2016.094>. Disponível em: <https://www.nps.org.au/australian-prescriber/articles/talimogene-laherparepvec>.

OCKERT, D. *et al.* **Newcastle disease virus-infected intact autologous tumor cell vaccine for adjuvant active specific immunotherapy of resected colorectal carcinoma - PubMed**. 1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9816085/>. Acesso em: 12 jan. 2025.

OIE. Newcastle disease. *In*: **OIE Terrestrial Manual. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees)**. 7. ed., Paris, France: Biological Standards Commission, World Organization for Animal Health, 2012. v. 1. p. 555–574. ISBN: 9789290448785. Disponível em: www.oie.int.

OLIVEIRA, M. R. *et al.* Hematological and biochemical alterations in female dogs with mammary cancer and inflammatory carcinoma. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [s. l.], v. 74, n. 3, p. 428–436, 2022. ISSN: 0102-0935. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-12471>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/HtFLQpkBqbd3PwS9wwxrmbT/>. Acesso em: 24 abr. 2025.

OSALI, A. *et al.* Multidirectional strategies for targeted delivery of oncolytic viruses by tumor infiltrating immune cells. **Pharmacological Research**, [s. l.], v. 161, 2020. ISSN: 10436618. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105094>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S104366182031402X>.

OTHMAN, F. *et al.* Oncolytic effect of Newcastle Disease virus AF2240 strain on the MCF-7 breast cancer cell line. **Yakhteh**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 17–24, 2010. ISSN: 15614921. Disponível em: <https://celljournal.org/library/upload/article/3 Othman.pdf>.

OWEN, L. N.; UNIT, W. H. Organization. V. P. H.; ONCOLOGY, W. C. C. for C. TNM Classification of Tumours in Domestic Animals/ edited by L.N. Owen. [s. l.], 1980. Disponível em: <https://iris.who.int/handle/10665/68618>. Acesso em: 13 jan. 2025.

PANDA, A. *et al.* Role of fusion protein cleavage site in the virulence of Newcastle Disease virus. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 1–10, 2004. ISSN: 08824010. DOI: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2003.07.003>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7125746/>.

PAOLONI, M.; KHANNA, C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. **Nature reviews. Cancer**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 147–156, 2008. ISSN: 1474-1768. DOI: <https://doi.org/10.1038/NRC2273>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18202698/>. Acesso em: 4 fev. 2025.

PAPAZOGLU, L. Current Surgical Options for Mammary Tumor Removal in Dogs. **Journal of Veterinary Science & Medicine**, [s. l.], v. 1, n. 1, 2012. ISSN: [ISSN: 2325-4645]. DOI: <https://doi.org/10.13188/2325-4645.1000007>. Disponível em: <https://www.avensonline.org/fulltextarticles/JVSM-2325-4645-02-0007.html>. Acesso em: 4 fev. 2025.

PAPPARELLA, S. *et al.* Reproducibility and Feasibility of Classification and National Guidelines for Histological Diagnosis of Canine Mammary Gland Tumours: A Multi-Institutional Ring Study. **Veterinary Sciences**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 357, 2022. ISSN:

23067381. DOI: <https://doi.org/10.3390/VETSCI9070357/S1>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9325225/>. Acesso em: 12 jan. 2025.

PARK, M.-S. *et al.* Newcastle Disease virus V Protein is a determinant of host range restriction. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 77, n. 17, p. 9522–9532, 2003. ISSN: 0022-538X. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/JVI.77.17.9522-9532.2003>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12915566/>.

PATHAK, U.; PAL, R. B.; MALIK, N. The Viral Knock: Ameliorating Cancer Treatment with Oncolytic Newcastle Disease Virus. **Life**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 1626, 2023. ISSN: 20751729. DOI: <https://doi.org/10.3390/LIFE13081626>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10455894/>. Acesso em: 7 jan. 2025.

PATIL, S. S. *et al.* Oncolytic virotherapy in veterinary medicine: current status and future prospects for canine patients. **Journal of translational medicine**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2012. ISSN: 1479-5876. DOI: <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-3>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22216938/>. Acesso em: 17 fev. 2025.

PECORA, A. L. *et al.* Phase I trial of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, in patients with advanced solid cancers. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 20, n. 9, p. 2251–2266, 2002. ISSN: 0732-183X. DOI: <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.08.042>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11980996/>. Acesso em: 9 jan. 2025.

PEEPLES, M. E.; BRATT, M. A. Mutation in the matrix protein of Newcastle Disease virus can result in decreased fusion glycoprotein incorporation into particles and decreased infectivity. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 81–90, 1984. ISSN: 0022-538X. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.51.1.81-90.1984>. Disponível em: <https://jvi.asm.org/content/51/1/81>.

PEETERS, B. P. H. *et al.* Rescue of Newcastle Disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 73, n. 6, p. 5001–5009, 1999. ISSN: 0022-538X. DOI:

<https://doi.org/https://doi.org/10.1128/JVI.73.6.5001-5009.1999>. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC112544/>.

PELNER, L.; FOWLER, G. A.; NAUTS, H. C. Effects of concurrent infections and their toxins on the course of leukemia. **Acta medica Scandinavica. Supplementum**, [s. l.], v. 162, n. 338, p. 5–24, 1958. ISSN: 0365463X. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.0954-6820.1958.tb17327.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.0954-6820.1958.tb17327.x>.

PRADO, M. C. M. *et al.* Investigation of the Prognostic Significance of Vasculogenic Mimicry and Its Inhibition by Sorafenib in Canine Mammary Gland Tumors. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 9, p. 1445, 2019. ISSN: 2234943X. DOI: <https://doi.org/10.3389/FONC.2019.01445>. Disponível em:
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6930929/>. Acesso em: 14 jan. 2025.

RAGHUNATH, S. *et al.* Genetically engineered oncolytic Newcastle Disease virus mediates cytolysis of prostate cancer stem like cells. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 260, p. 91–97, 2017. ISSN: 01681656. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.09.015>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165617316553>.

RAIHAN, J. *et al.* Regression of solid breast tumours in mice by Newcastle Disease virus is associated with production of apoptosis related-cytokines. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 19, n. 1, 2019. ISSN: 1471-2407. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5516-5>. Disponível em:
<https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-019-5516-5>.

RAJMANI, R. S. *et al.* Oncolytic effect of Newcastle disease virus via immune response in dog mammary tumor xenograft in mice. In: XX NATIONAL CONFERENCE ON MANAGING EMERGING AND RE-EMERGING PLANT, ANIMAL, HUMAN AND AQUATIC VIRAL DISEASES: ONE HEALTH PERSPECTIVE HELD AT NATIONAL RESEARCH CENTRE 2011, **Anais [...]**. [S. l.: s. n.], Disponível em:
https://www.researchgate.net/publication/273000647_Oncolytic_effect_of_Newcastle_disease_virus_via_immune_response_in_dog_mammary_tumor_xenograft_in_mice.

RAMAN, S. S.; HECHT, J. R.; CHAN, E. Talimogene laherparepvec: review of its mechanism of action and clinical efficacy and safety. **Immunotherapy**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 705–723, 2019. ISSN: 1750-7448. DOI: <https://doi.org/10.2217/IMT-2019-0033>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31045464/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

RESTIFO, N. P.; SMYTH, M. J.; SNYDER, A. Acquired resistance to immunotherapy and future challenges. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 121–126, 2016. ISSN: 1474-175X. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nrc.2016.2>. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrc.2016.2>.

RÖMER-OBERDÖRFER, A. *et al.* Contribution of the length of the HN protein and the sequence of the F protein cleavage site to Newcastle disease virus pathogenicity. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 84, n. 11, p. 3121–3129, 2003. ISSN: 0022-1317. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/vir.0.19416-0>. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.19416-0>.

ROSSMEISL, J. H. *et al.* INVITED REVIEW – NEUROIMAGING RESPONSE ASSESSMENT CRITERIA FOR BRAIN TUMORS IN VETERINARY PATIENTS. **Veterinary radiology & ultrasound : the official journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association**, [s. l.], v. 55, n. 2, p. 115, 2013. ISSN: 10588183. DOI: <https://doi.org/10.1111/VRU.12118>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3949168/>. Acesso em: 4 fev. 2025.

ROSSMEISL, J. H. *et al.* Phase I/II Trial of Urokinase Plasminogen Activator-Targeted Oncolytic Newcastle Disease Virus for Canine Intracranial Tumors. **Cancers**, [s. l.], v. 16, n. 3, 2024. ISSN: 2072-6694. DOI: <https://doi.org/10.3390/CANCERS16030564>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38339315/>. Acesso em: 16 jan. 2025.

SAMAL, S. *et al.* A single amino acid change, Q114R, in the cleavage-site sequence of Newcastle Disease virus fusion protein attenuates viral replication and pathogenicity. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 92, n. 10, p. 2333–2338, 2011. ISSN: 00221317. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/vir.0.033399-0>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21677091/>.

SANCHEZ., D. *et al.* In Vitro and in Vivo oncolytic activity of LaSota strain of Newcastle Disease Virus on a lymphoma B-Cell line and a canine cutaneous T-cell lymphoma. **Blood**, [s. l.], v. 124, n. 21, p. 5504, 2014. ISSN: 0006-4971. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1182/blood.V124.21.5504.5504>.

SÁNCHEZ, D. *et al.* Newcastle Disease virus: potential therapeutic application for human and canine lymphoma. **Viruses**, [s. l.], v. 8, n. 1, 2016. ISSN: 1999-4915. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/v8010003>. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1999-4915/8/1/3>.

SÁNCHEZ, D. *et al.* Oncolytic viruses for canine cancer treatment. **Cancers**, [s. l.], v. 10, n. 11, 2018. ISSN: 20726694. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/cancers10110404>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30373251/>.

SÁNCHEZ, D. *et al.* The NDV-MLS as an Immunotherapeutic Strategy for Breast Cancer: Proof of Concept in Female Companion Dogs with Spontaneous Mammary Cancer. **Viruses**, [s. l.], v. 16, n. 3, 2024. ISSN: 1999-4915. DOI: <https://doi.org/10.3390/V16030372>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38543739/>. Acesso em: 16 jan. 2025.

SANTOS, M. R. *et al.* Oncolytic effect of Newcastle disease virus is attributed to interferon regulation in canine mammary cancer cell lines. **Veterinary and Comparative Oncology**, [s. l.], p. 1–9, 2021. ISSN: 1476-5829. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/vco.12699>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/vco.12699>.

SCHIRRMACHER, V. Antitumor immune memory and its activation for control of residual tumor cells and improvement of patient survival: A new concept derived from translational research with the virusmodified tumor vaccine ATV-NDV. **Viral Therapy of Human Cancers**, [s. l.], p. 481–532, 2004. ISBN: 9781420030402. DOI: <https://doi.org/10.1201/B14180-7/ANTITUMOR-IMMUNE-MEMORY-ACTIVATION-CONTROL-RESIDUAL-TUMOR-CELLS-IMPROVEMENT-PATIENT-SURVIVAL-NEW-CONCEPT-DERIVED-TRANSLATIONAL-RESEARCH-VIRUS-MODIFIED-TUMOR-VACCINE-ATV-NDV-VOLKER-SCHIRRMACHER>. Disponível em: <https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/b14180-7/antitumor-immune-memory-activation-control-residual-tumor-cells-improvement-patient-survival-new-concept-derived->

translational-research-virus-modified-tumor-vaccine-atv-ndv-volker-schirmacher. Acesso em: 12 jan. 2025.

SCHIRRMACHER, V. Immunobiology of Newcastle Disease virus and its use for prophylactic vaccination in poultry and as adjuvant for therapeutic vaccination in cancer patients. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 18, n. 5, 2017. ISSN: 1422-0067. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms18051103>. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1422-0067/18/5/1103>.

SCHIRRMACHER, V. *et al.* Long-term survival of a breast cancer patient with extensive liver metastases upon immune and virotherapy: a case report. **Immunotherapy**, [s. l.], v. 7, n. 8, p. 855–860, 2015. ISSN: 1750-7448. DOI: <https://doi.org/10.2217/IMT.15.48>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26020523/>. Acesso em: 9 jan. 2025.

SCHIRRMACHER, V. *et al.* Newcastle Disease virus activates macrophages for anti-tumor activity. **Journal of Oncology**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 363–273, 2000. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.3892/ijo.16.2.363>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10639582/>.

SCHIRRMACHER, V. Oncolytic Newcastle disease virus as a prospective anti-cancer therapy. A biologic agent with potential to break therapy resistance. **Expert opinion on biological therapy**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. 1757–1771, 2015. ISSN: 1744-7682. DOI: <https://doi.org/10.1517/14712598.2015.1088000>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26436571/>.

SCHIRRMACHER, V.; FOURNIER, P. Newcastle Disease virus: a promising vector for viral therapy, immune therapy, and gene therapy of cancer. In: **Methods in Molecular Biology**. [S. l.: s. n.], . v. 542. p. 565–605. ISSN: 10643745. DOI: https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-59745-561-9_30. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-561-9_30.

SCHIRRMACHER, V.; VAN GOOL, S.; STUECKER, W. Breaking therapy resistance: an update on oncolytic Newcastle Disease virus for improvements of cancer therapy. **Biomedicines**, [s. l.], v. 7, n. 3, 2019. ISSN: 22279059. DOI:

<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/biomedicines7030066>. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31480379/>.

SCHULZE, T. *et al.* Efficiency of adjuvant active specific immunization with Newcastle disease virus modified tumor cells in colorectal cancer patients following resection of liver metastases: Results of a prospective randomized trial. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, [s. l.], v. 58, n. 1, p. 61–69, 2009. ISSN: 03407004. DOI: <https://doi.org/10.1007/S00262-008-0526-1>. Acesso em: 12 jan. 2025.

SEGEV, G. **Serum Creatinine Concentration: Useful Tips for Correct Interpretation World Small Animal Veterinary Association Congress Proceedings**. 2018. Disponível em: <https://www.vin.com/apputil/content/defaultadv1.aspx?pId=22915&catId=124658&id=8896680>. Acesso em: 7 fev. 2025.

SEMIGLAZOV, V. *et al.* Immunology and immunotherapy in breast cancer. **Cancer Biology & Medicine**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 609, 2022. ISSN: 20953941. DOI: <https://doi.org/10.20892/J.ISSN.2095-3941.2021.0597>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9196061/>. Acesso em: 12 jan. 2025.

SERRANO-DEL VALLE, A. *et al.* Immunogenic cell death and immunotherapy of multiple myeloma. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 7, 2019. ISSN: 2296-634X. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00050>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2019.00050/full>.

SHAN, P. *et al.* NDV-D90 inhibits 17 β -estradiol-mediated resistance to apoptosis by differentially modulating classic and nonclassic estrogen receptors in breast cancer cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 122, n. 1, p. 3–15, 2021. ISSN: 1097-4644. DOI: <https://doi.org/10.1002/JCB.28118>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcb.28118>. Acesso em: 9 jan. 2025.

SHAO, X. *et al.* STAT3 contributes to oncolytic Newcastle Disease virus-induced immunogenic cell death in melanoma cells. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 9, 2019. ISSN: 2234-943X. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00436>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2019.00436/full>.

SIDDIQUI, F. *et al.* A phase I trial of hyperthermia-induced interleukin-12 gene therapy in spontaneously arising feline soft tissue sarcomas. **Molecular cancer therapeutics**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 380–391, 2007. ISSN: 1535-7163. DOI: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0342>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17237297/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

SILVA SOARES, E. *et al.* Prognostic Factors for Cancer-Specific Survival and Disease-Free Interval of Dogs with Mammary Carcinomas. **Veterinary Medicine International**, [s. l.], v. 2023, n. 1, p. 6890707, 2023. ISSN: 2042-0048. DOI: <https://doi.org/10.1155/2023/6890707>. Disponível em: </doi/pdf/10.1155/2023/6890707>. Acesso em: 24 abr. 2025.

SINKOVICS, J. Studies on the biological characteristics of the newcastle disease virus (NDV) adapted to the brain of newborn mice. **Archiv for die gesamte Virusforschung**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 403–411, 1957. ISSN: 0304-8608. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF01240748>. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/BF01240748>.

SINKOVICS, J. G.; HORVATH, J. C. Newcastle disease virus (NDV): brief history of its oncolytic strains. **Journal of Clinical Virology**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 1–15, 2000. ISSN: 13866532. DOI: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1386-6532\(99\)00072-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1386-6532(99)00072-4). Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386653299000724>.

SMITH, B. F. *et al.* Administration of a conditionally replicative oncolytic canine adenovirus in normal dogs. **Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 601–606, 2006. ISSN: 1084-9785. DOI: <https://doi.org/10.1089/CBR.2006.21.601>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17257075/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

SONG, H. *et al.* Application of Newcastle disease virus in the treatment of colorectal cancer. **World Journal of Clinical Cases**, [s. l.], v. 7, n. 16, p. 2143–2154, 2019. ISSN: 2307-8960. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.12998/wjcc.v7.i16.2143>. Disponível em: <https://www.wjgnet.com/2307-8960/full/v7/i16/2143.htm>.

SORENMO, K. U. *et al.* Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. **Veterinary pathology**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 85–97, 2011. ISSN: 1544-2217. DOI: <https://doi.org/10.1177/0300985810389480>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21147765/>. Acesso em: 9 jan. 2025.

SORENMO, K. U.; DEANNA, R. W.; GOLDSMIDT, R. H. Tumors of the mammary gland. *In*: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. (org.). **Withrow and Macewen's Small Animal Clinical Oncology**. 5. ed., Philadelphia: Saunders, 2013. p. 553–571. ISBN: 9781437723632.

SOUZA, C. H. *et al.* Inflammatory mammary carcinoma in 12 dogs: Clinical features, cyclooxygenase-2 expression, and response to piroxicam treatment. **The Canadian Veterinary Journal**, [s. l.], v. 50, n. 5, p. 506, 2009. ISSN: 00085286. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2671873/>. Acesso em: 13 jan. 2025.

SPUGNINI, E. P.; BALDI, A. Electrochemotherapy in Veterinary Oncology: State-of-the-Art and Perspectives. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, [s. l.], v. 49, n. 5, p. 967–979, 2019. ISSN: 1878-1306. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.CVSM.2019.04.006>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31176458/>. Acesso em: 19 fev. 2025.

SUGAWARA, K. *et al.* Oncolytic herpes virus G47 Δ works synergistically with CTLA-4 inhibition via dynamic intratumoral immune modulation. **Molecular therapy oncolytics**, [s. l.], v. 22, p. 129–142, 2021. ISSN: 2372-7705. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.OMTO.2021.05.004>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34514094/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

SUN, C. *et al.* Roles of the highly conserved amino acids in the globular head and stalk region of the Newcastle Disease virus HN protein in the membrane fusion process. **BioScience Trends**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 56–64, 2015. ISSN: 18817823. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.5582/bst.2014.01140>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25787910/>.

SUTER, S. E. *et al.* In vitro canine distemper virus infection of canine lymphoid cells: a prelude to oncolytic therapy for lymphoma. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 1579–1587, 2005. ISSN: 1078-0432. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1944>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15746063/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

SWAMINATHAN, A. **Effect of Newcastle disease virus AF2240 on allografted 4T1 breast cancer cells in balb / c mice**. 2010. 15 f. Degree os Masters of Science - Universiti Putra Malaysia, [s. l.], 2010. Disponível em: <https://core.ac.uk/reader/153804230>.

SZALAY, A. A. *et al.* Significant Growth Inhibition of Canine Mammary Carcinoma Xenografts following Treatment with Oncolytic Vaccinia Virus GLV-1h68. **Journal of oncology**, [s. l.], v. 2010, 2010. ISSN: 1687-8469. DOI: <https://doi.org/10.1155/2010/736907>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20631910/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, [s. l.], v. 140, n. 6, p. 805–820, 2010. ISSN: 00928674. DOI: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20303872/>.

TAN, L. *et al.* Newcastle disease virus employs macropinocytosis and Rab5a-dependent intracellular trafficking to infect DF-1 cells. **Oncotarget**, [s. l.], v. 7, n. 52, p. 86117, 2016. ISSN: 19492553. DOI: <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.13345>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5349901/>. Acesso em: 12 jan. 2025.

TAP, W. D. *et al.* Olaratumab and doxorubicin versus doxorubicin alone for treatment of soft-tissue sarcoma: an open-label phase 1b and randomised phase 2 trial. **The Lancet**, [s. l.], v. 388, n. 10043, p. 488–497, 2016. ISSN: 01406736. DOI: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30587-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30587-6). Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673616305876>.

TAYEB, S.; ZAKAY-RONES, Z.; PANET, A. Therapeutic potential of oncolytic Newcastle Disease virus a critical review. **Oncolytic Virotherapy**, [s. l.], v. 4, p. 49–62, 2015. ISSN: 2253-1572. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.2147/OV.S78600>. Disponível em:

<http://www.dovepress.com/therapeutic-potential-of-oncolytic-newcastle-disease-virus-a-critical-peer-reviewed-article-OV>.

TENG, M. W. L. *et al.* Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. **Journal of Leukocyte Biology**, [s. l.], v. 84, n. 4, p. 988–993, 2008. ISSN: 07415400. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1189/jlb.1107774>. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1189/jlb.1107774>.

TERNOVOI, V. V. *et al.* Productive replication of human adenovirus type 5 in canine cells. **Journal of virology**, [s. l.], v. 79, n. 2, p. 1308–1311, 2005. ISSN: 0022-538X. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.79.2.1308-1311.2005>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15613357/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

THRALL, M. A. *et al.* **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2. ed., São Paulo: Roca, 2015.

TOLOSA, E. M. C. De *et al.* Manual de técnicas para histologia: normal e patológica. [s. l.], p. 331, 2003. ISBN: 85-204-1440-0. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/001465062>. Acesso em: 1 fev. 2025.

UL-RAHMAN, A. *et al.* **Zoonotic potential of Newcastle disease virus: Old and novel perspectives related to public health. Reviews in Medical Virology** John Wiley and Sons Ltd, 2022. (1) ISSN: 10991654. DOI: <https://doi.org/10.1002/rmv.2246>.

URBASIC, A. S. *et al.* Oncolysis of canine tumor cells by myxoma virus lacking the *serp2* gene. **American journal of veterinary research**, [s. l.], v. 73, n. 8, p. 1252–1261, 2012. ISSN: 1943-5681. DOI: <https://doi.org/10.2460/AJVR.73.8.1252>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22849686/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

VAFAEI, R. *et al.* Comparison of mucin-1 in human breast cancer and canine mammary gland tumor: a review study. **Cancer Cell International**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 14, 2022. ISSN: 14752867. DOI: <https://doi.org/10.1186/S12935-021-02398-6>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8744232/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

VAJDIC, C. M.; VAN LEEUWEN, M. T. Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. **International Journal of Cancer**, [s. l.], v. 125, n. 8, p. 1747–1754, 2009. ISSN: 00207136. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ijc.24439>. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.24439>.

VIJAYAKUMAR, G.; PALESE, P.; GOFF, P. H. Oncolytic Newcastle Disease virus expressing a checkpoint inhibitor as a radioenhancing agent for murine melanoma. **EBioMedicine**, [s. l.], v. 49, p. 96–105, 2019. ISSN: 23523964. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.10.032>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352396419307029>.

VILLAR, E.; BARROSO, I. M. Role of sialic acid-containing molecules in paramyxovirus entry into the host cell: a minireview. **Glycoconjugate Journal**, [s. l.], v. 23, n. 1–2, p. 5–17, 2006. ISSN: 02820080. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10719-006-5433-0>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16575518/>.

WANG, Y. *et al.* Two mutations in the HR2 region of Newcastle Disease virus fusion protein with a cleavage motif “RRQRRL” are critical for fusogenic activity. **Virology Journal**, [s. l.], v. 14, n. 1, 2017. ISSN: 1743-422X. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s12985-017-0851-0>. Disponível em: <http://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12985-017-0851-0>.

WANG, S. L.; LEE, J. J.; LIAO, A. T. Comparison of efficacy and toxicity of doxorubicin and mitoxantrone in combination chemotherapy for canine lymphoma. **The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne**, [s. l.], v. 57, n. 3, p. 271–276, 2016. ISSN: 00085286. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26933263/>.

WANG, J.; LI, Mengqing; LI, Meng. Newcastle disease virus LaSota strain induces apoptosis and activates the TNF α /NF- κ B pathway in canine mammary carcinoma cells. **Veterinary and Comparative Oncology**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 520–532, 2023. ISSN: 1476-5829. DOI: <https://doi.org/10.1111/VCO.12915>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/vco.12915>. Acesso em: 16 jan. 2025.

WARBURG, O. On the origin of cancer cells. **Science**, [s. l.], v. 123, n. 3191, p. 309–314, 1956. ISSN: 0036-8075. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>. Disponível em: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.123.3191.309>.

WARBURG, O. H. The Metabolism of Tumours: Investigations from the Kaiser Wilhelm Institute for Biology, Berlin-Dahlem. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, [s. l.], v. 96, n. 23, 1931. ISSN: 0098-7484. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.1931.02720490062043>.

WASHBURN, B. *et al.* TNF-related apoptosis-inducing ligand mediates tumoricidal activity of human monocytes stimulated by Newcastle disease virus. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [s. l.], v. 170, n. 4, p. 1814–1821, 2003. ISSN: 0022-1767. DOI: <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.170.4.1814>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12574346/>. Acesso em: 10 jan. 2025.

WEI, D. *et al.* Fighting Cancer with Viruses: Oncolytic Virus Therapy in China. **Human gene therapy**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 151–159, 2018. ISSN: 1557-7422. DOI: <https://doi.org/10.1089/HUM.2017.212>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29284308/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

WELCH, B. D. *et al.* Probing the functions of the paramyxovirus glycoproteins F and HN with a panel of synthetic antibodies. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 88, n. 20, p. 11713–11725, 2014. ISSN: 0022-538X. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.01707-14>. Disponível em: <https://jvi.asm.org/content/88/20/11713>.

WESTBERG, S. *et al.* Treatment efficacy and immune stimulation by AdCD40L gene therapy of spontaneous canine malignant melanoma. **Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)**, [s. l.], v. 36, n. 6, p. 350–358, 2013. ISSN: 1537-4513. DOI: <https://doi.org/10.1097/CJI.0B013E31829D8A1B>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23799414/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

WHEELOCK, E. F.; DINGLE, J. H. Observations on the repeated administration of viruses to a patient with acute leukemia - a preliminary report. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 271, n. 13, p. 645–651, 1964. ISSN: 0028-4793. DOI:

<https://doi.org/https://doi.org/10.1056/NEJM196409242711302>. Disponível em:
<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM196409242711302>.

WILLIAMS, C. B.; YEH, E. S.; SOLOFF, A. C. Tumor-associated macrophages: unwitting accomplices in breast cancer malignancy. **NPJ Breast Cancer**, [s. l.], v. 2, n. 1, 2016. ISSN: 2374-4677. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/npjbcancer.2015.25>. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/npjbcancer201525>.

WU, Y. *et al.* Recombinant Newcastle Disease virus expressing human TRAIL as a potential candidate for hepatoma therapy. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 802, p. 85–92, 2017. ISSN: 18790712. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.02.042>.

YAACOV, B. *et al.* Selective oncolytic effect of an attenuated Newcastle Disease virus (NDV-HUJ) in lung tumors. **Cancer Gene Therapy**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. 795–807, 2008. ISSN: 0929-1903. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/cgt.2008.31>. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/cgt200831>.

YANG, H. *et al.* The Application of Newcastle Disease Virus (NDV): Vaccine Vectors and Tumor Therapy. **Viruses**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 886, 2024. ISSN: 19994915. DOI: <https://doi.org/10.3390/V16060886>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11209082/>. Acesso em: 8 jan. 2025.

YE, T. *et al.* Oncolytic Newcastle disease virus induces autophagy-dependent immunogenic cell death in lung cancer cells. **American journal of cancer research**, [s. l.], v. 8, n. 8, p. 1514–1527, 2018. ISSN: 2156-6976. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6129498/>.

YURCHENKO, K. S. *et al.* Oncolytic effect of wild-type Newcastle disease virus isolates in cancer cell lines in vitro and in vivo on xenograft model. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 13, n. 4, 2018. ISSN: 1932-6203. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195425>. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0195425>.

ZAMARIN, D. *et al.* Localized Oncolytic Virotherapy Overcomes Systemic Tumor Resistance to Immune Checkpoint Blockade Immunotherapy. **Science Translational**

Medicine, [s. l.], v. 6, n. 226, p. 226–232, 2014. ISSN: 1946-6234. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008095>. Disponível em: <https://stm.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/scitranslmed.3008095>.

ZAMARIN, D.; PALESE, P. Oncolytic Newcastle Disease Virus for cancer therapy: old challenges and new directions. **Future microbiology**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 347, 2012. ISSN: 17460913. DOI: <https://doi.org/10.2217/FMB.12.4>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4241685/>. Acesso em: 7 jan. 2025.

ZAMARIN, D.; WOLCHOK, J. D. Potentiation of immunomodulatory antibody therapy with oncolytic viruses for treatment of cancer. **Molecular Therapy - Oncolytics**, [s. l.], v. 1, 2014. ISSN: 23727705. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/mto.2014.4>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2372770516300262>.

ZAPPULLI, V. *et al.* Mammary tumors. In: **Surgical Pathology of Tumors of Domestic Animals**. Washington: Davis-Thompson DVM Foundation, 2018. v. 2. p. 1–195.

ZENG, J.; FOURNIER, P.; SCHIRRMACHER, V. Induction of Interferon- α and Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand in Human Blood Mononuclear Cells by Hemagglutinin-Neuraminidase but Not F Protein of Newcastle Disease Virus. **Virology**, [s. l.], v. 297, n. 1, p. 19–30, 2002. ISSN: 00426822. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/viro.2002.1413>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682202914133>.

ZHAN, Y. *et al.* Newcastle Disease virus infection activates PI3K/Akt/mTOR and p38 MAPK/Mnk1 pathways to benefit viral mRNA translation via interaction of the viral NP protein and host eIF4E. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. e1008610, 2020. ISSN: 15537374. ISBN: 1111111111. DOI: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1008610>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7326156/>. Acesso em: 8 jan. 2025.

ZHAO, H. *et al.* Recombinant Newcastle Disease virus expressing human interleukin-2 serves as a potential candidate for tumor therapy. **Virus Research**, [s. l.], v. 136, n. 1–2, p. 75–80, 2008. ISSN: 01681702. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.04.020>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016817020800169X>.

ZULKIFLI, M. M. *et al.* Newcastle diseases virus strain V4UPM displayed oncolytic ability against experimental human malignant glioma. **Neurological Research**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 3–10, 2009. ISSN: 0161-6412. DOI:

<https://doi.org/https://doi.org/10.1179/174313208x325218>. Disponível em:

<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/174313208X325218>.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Dados epidemiológicos, avaliações clinicopatológicas e intervenções veterinárias em cadelas portadoras de tumores mamários espontâneos, tratadas com a cepa La Sota do vírus da doença de Newcastle.

Dias	0			17 - 36	42 - 61			63 - 77	82	90 - 92	147	154	204	206	209-233	235-245
Parâmetros	P1	P2	P3	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P1	P2	P1	P3	P1	P2	P1
Dados epidemiológicos																
Idade (anos)	14,1	6	11										11,6		7,6	14,8
Raça	SRD	SRD	Pit Bull													
Peso (Kg)	8,6	12	39,7									8,9			12,3	8,1
Score corporal (1-5) (Montoya et al., 2023)	3	4	3										2		4	3
Status reprodutivo	NC	NC	NC							Castrada	Castrada					
Uso de progestágeno	SIM	SIM	NÃO													
Avaliações clinicopatológicas																
Nódulos mamários palpáveis (Ne)	4	2	4							3	1	4	4		1	
Exame citopatológico (técnica)	PAAF	PAF	PAF													
Amstras para exame histopatológico										M1-M5d/Lid	M1-M5d/Lid					
Estadiamento clínico (I - V)	II	II													I	V
Intervenções veterinárias																
Dose intravenosa da cepa La Sota (ml)				0,8		0,24 - 0,25		0,16 - 0,18								
Hemograma				SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM			SIM	SIM	SIM	SIM	SIM
Pesquisa de hemoparasitas				SIM		SIM										
Testes moleculares (técnica)		TR-DPP + ELISA					RT-PCR									
Bioquímicos				SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM			SIM	SIM	SIM	SIM	SIM
Urinálise (técnica)														Cistocentese		
Radiografia torácica				SIM	SIM	SIM						SIM	SIM	SIM	SIM	SIM
Ultrassonografia abdominal				SIM		SIM				SIM						
Eletrocardiograma (ECG)						SIM				SIM						
Ecodoppler cardiograma (ECO)						SIM				SIM						
Cirurgia (técnica)									MRUD/OH	MRUD/OH						
Atendimento emergencial																SIM
Internação em UTI																SIM
Toracocentese																SIM
Prescrição de medicamentos				SIM		SIM				SIM	SIM					SIM

LID: linfonodo inguinal direito; **M1-M5d:** cadeia mamária direita, glândulas 1 a 5; **MRUD:** mastectomia radical unilateral direita; **MRUD/OH:** mastectomia radical unilateral direita + ovariectomia; **NC:** não castrada; **PAAF:** punção aspirativa por agulha fina; **PAF:** punção por agulha fina; **RT-PCR:** reação em cadeia da polimerase em tempo real; **SRD:** sem raça definida; **TR-DPP/ELISA:** teste rápido por duplo plano paralelo/ensaio de imunoabsorção enzimática; **UTI:** unidade de tratamento intensivo; **P1:** paciente 1; **P2:** paciente 2; **P3:** paciente 3.

CAPÍTULO IV – CONSIDERAÇÕES FINAIS

O vírus da doença de Newcastle (VDN) é um vírus aviário que, há mais de cinco décadas, tem sido objeto de pesquisas na área de viroterapia devido à sua capacidade seletiva para células tumorais e ao seu potencial de estimular a resposta antitumoral do sistema imunológico. Embora diversos estudos tenham sido conduzidos para avaliar o efeito oncolítico do VDN em células neoplásicas humanas e em pacientes oncológicos, ainda são escassas as investigações acerca de seu efeito oncolítico em células neoplásicas de animais e em caninos portadores de tumores espontâneos.

No presente estudo, avaliaram-se os efeitos oncolíticos do VDN em células neoplásicas humanas PC-3, células neoplásicas caninas CMT-U27 e em cadelas portadoras de tumores mamários espontâneos. A cepa La Sota do VDN demonstrou capacidade de induzir lise celular nas linhagens tumorais *in vitro*, sem causar citotoxicidade significativa às células normais. Além de sua atividade citotóxica *in vitro*, o VDN evidenciou capacidade de reduzir xenoenxertos de células neoplásicas PC-3 em modelo de membrana corioalantoide.

Ademais, em cadelas submetidas à infusões intravenosas da cepa La Sota, o tratamento intravenoso mostrou-se seguro, ocasionando apenas eventos adversos leves a moderados relacionados à viroterapia. Entretanto, as respostas clínicas foram heterogêneas entre as pacientes, evidenciando a complexidade da interação entre o vírus e o microambiente tumoral.

Os achados deste estudo, corroboram a hipótese de que o VDN pode lisar células tumorais preservando as células normais e estimulando o sistema imunológico. No entanto, os dados apresentados ressaltam a necessidade de investigações adicionais, a fim de elucidar melhor os mecanismos de ação do vírus, especialmente no que tange ao seu efeito citotóxico e à modulação da resposta imune contra células neoplásicas.

Além disso, torna-se fundamental a realização de ensaios terapêuticos com um número amostral mais expressivo, maior tempo de acompanhamento clínico e diferentes esquemas posológicos. A utilização de vírus recombinantes também se mostra uma estratégia relevante para potencializar seus efeitos.

Durante o estudo, uma das principais dificuldades foi a seleção de animais conforme os critérios de inclusão estabelecidos, bem como a participação ativa dos tutores em todas as etapas do protocolo experimental, o que era essencial para uma adequada avaliação da resposta terapêutica. Adicionalmente, o acompanhamento clínico e laboratorial é dispendioso, o que pode representar um desafio adicional.

Apesar desses desafios, os resultados obtidos evidenciam o potencial citotóxico do VDN sobre células tumorais. Para que essa abordagem terapêutica seja, no futuro, aprovada por

órgãos regulatórios e incorporada à prática clínica, torna-se imprescindível o desenvolvimento de protocolos terapêuticos mais seguros e eficazes. Nesse sentido, a investigação de combinações terapêuticas, bem como a exploração de estratégias de recombinação viral, pode ampliar a eficácia do tratamento.

Dessa forma, uma compreensão aprofundada das vias de lise tumoral induzidas pelo VDN e do seu impacto na resposta imunológica é essencial para determinar o real potencial desse vírus como agente terapêutico no tratamento de neoplasias mamárias em cadelas e mulheres.