



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

EVALUACIÓN DE LA INDUCCIÓN DE APOPTOSIS EN EL GLIOMA C6  
MURINO MEDIANTE LA APLICACIÓN TERAPÉUTICA DE FACTOR DE  
TRANSFERENCIA ESPECÍFICO (Fte)

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

**PRESENTA:**

**SAMANTA ESTHER ROMERO SILVA**

ASESOR: M. en C. IGNACIO CARLOS RANGEL RODRÍGUEZ

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2005

m344929



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE  
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Evaluación de la inducción de Apoptosis en el Glioma C 6 murino mediante la aplicación  
terapéutica de Factor de Transferencia Específico (FTE).

que presenta la pasante: Samanta Esther Romero Silva  
con número de cuenta: 9122930-8 para obtener el título de :  
Médica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 10 de Septiembre de 2004

PRESIDENTE	M.C. José Antonio Licea Vega	<u>José Antonio Licea Vega</u>
VOCAL	Dr. Guillermo Valdivia Anda	<u>[Firma]</u>
SECRETARIO	M.C. Ignacio Carlos Rangel Rodríguez	<u>[Firma]</u>
PRIMER SUPLENTE	MVZ. Olivia Adams Vázquez	<u>[Firma]</u>
SEGUNDO SUPLENTE	MVZ. Alejandro Sánchez Pacheco	<u>[Firma]</u>

## DEDICATORIAS

**Dedico este trabajo a Marisela Silva Franco:** mi madre, mi amiga, mi mejor crítica, mi compañera de vida. Por el amor, las caricias, las nalgadas y jalones de orejas; por llenar mi alma y mi corazón de sed de vivir y de emociones; por la sal que ha dado sabor a las desveladas, a las malpasadas; por tantos abrazos que me protegieron de la tristeza y los aplausos que me levantaron tantas y tantas veces. Por ser dadora de vida y de aliento; por haber estado al pie del cañón y en mi cabecera velando por mis sueños: nuestros sueños que ahora son realidad. Por haber llenado mi existir de magia y poesía. Gracias mamá. Te amo.

Lo logramos!!!!!!!

**A mi hermana Greta Vanessa y a mi hermano Rodolfo** por sus desvelos, por sus consejos, por aguantar mi carácter, por darme una familia diferente y por el amor y el respeto a la vida que los caracteriza.

Los amo chavos.

**A Paula** mi hermosa sobrina por llenar mi vida de esperanza y de ternura. Aquí estaré para ti siempre

**A mi tía María Esther Silva Franco.** Porque has sido como una madre. Por tu ejemplo de perseverancia, de solidaridad y de cariño incondicional. Por darme un pedacito de tu corazón y por hacer de esta nuestra historia algo fuera de serie.

Te amo mami.

**A mis primos Nancy, Fernando y Christian** porque no habrá infancia más mágica ni realidad más perfecta que la que vivimos juntos. Gracias por existir.

**A mis abuelitos Don Fernando Silva Velázquez y Doña Paz Delgado Díaz** por enseñarme el valor de una familia, por perpetuar los valores humanos que han

sido mis bases y el principio de una vida exitosa. Gracias por toda una vida de calidad.

**A mi tía Georgina, a mi tío Marcos y a ti primo Marcos.** Por enseñarme que la vida tiene mucho que darle a los que han sido buenos y justos consigo mismos y porque me han permitido disfrutar de todo el bien que han logrado. ¡Gracias, cosmogónicos!

**A mis verdaderos AMIGOS:** a **Darío** por compartir conmigo la maravillosa capacidad de dar y el don de la honestidad, a **Silvia** por mostrarme el lado lúdico de la vida y por recorrer el camino espinado a mi lado, a **Carlos** por su apoyo y solidaridad y por su eterno respeto a la vida. Que la fuerza esté con ustedes!!!!!!

A **Nessie, Olaya, Trino, Pachita, Duquesa, Yamanqui, Paula, Lucas, Wilson, Lisa, Esther, Raymundo, "Chiquita", Vaquero...** y todos esos seres que ladrando o maullando han demostrado ser lo que mejor diseñó la naturaleza. Gracias también a todos aquellos que sacrificaron sus vidas para complacer la sed egoísta de conocimiento; que sin saber nos regalaron su último aliento, su última mirada y su último latido. No los decepcionaré.

"Lo único que podemos hacer es decidir qué hacer con el tiempo que se nos da..."

J.R.R. Tolkien.

## AGRADECIMIENTOS

### **A los Médicos Veterinarios Zootecnistas:**

M.V.Z. Olivia Adams Vázquez  
M. en C. José Antonio Licea Vega  
M.V.Z. Alejandro Sánchez Pacheco  
Dr. Ignacio S.

Por la orientación, por su paciencia y sobre todo por el apoyo para agilizar la culminación de este trabajo.

### **A los Doctores:**

Dra. Guadalupe Bravo  
Dr. Gabriel Guízar- Sahagún  
Dr. Antonio Ibarra  
Dr. Francisco Javier López Muñoz  
Dr. Carlos Villalón  
Dr. David Centurión

Por su apoyo en todo momento, por confiar en mi y por su enorme calidad humana.

**A Alejandra Pellicer, Rosalba Ramírez, Rosa María Martínez, Eufrosina Rodríguez, Judith Fonseca, Eduardo Remedi y a todos aquellos del Departamento de Investigaciones Educativas del CINVESTAV que me apuntalaron con su optimismo cuando más lo necesité.**

# ÍNDICE

	Páginas
<b>RESUMEN</b>	<b>I</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>III</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN. NEOPLASIAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC)</b>	<b>1</b>
1.1. Factores de riesgo ambientales u ocupacionales para neoplasias del Sistema Nervioso Central (SNC)	3
1.2. Causas de los tumores cerebrales	3
<b>2. CARACTERÍSTICAS DEL GLIOBLASTOMA MULTIFORME (GBM)</b>	<b>6</b>
2.1. Clasificación del Glioblastoma Multiforme (GBM) según el tipo celular y localización anatómica	6
2.2. Morfología del Glioblastoma Multiforme (GBM)	6
2.3. Progresión tumoral del Glioblastoma Multiforme (GBM)	8
2.4. Síntomas causados por Glioblastoma Multiforme (GBM)	9
2.5. Diagnóstico de Glioblastoma Multiforme (GBM)	10
2.6. Determinación del pronóstico de sobrevida	10
<b>2. TERAPÉUTICA CONVENCIONAL PARA GLIOBLASTOMA MULTIFORME (GBM)</b>	<b>13</b>
3.1. Carmustina (BCNU)	13
3.2. Efectos secundarios de la quimioterapia con Carmustina (BCNU)	14

3.3. Consecuencias a largo plazo en los pacientes que sobreviven	15
<b>3. FÁRMACOS EN INVESTIGACIÓN PARA SER UTILIZADOS EN TRATAMIENTOS DE TUMORES CEREBRALES</b>	<b>16</b>
4.1. Inmunoterapia	16
4.2. Factor de Transferencia Específico (FTe)	17
4.3. Enfermedades en las que el Factor de Transferencia ha tenido efectos terapéuticos	17
4.4. Estructura Química del Factor de Transferencia Específico (FTe)	19
4.5. Especificidad del Factor de Transferencia Específico (FTe)	20
4.6. Mecanismo de acción del Factor de Transferencia Específico (FTe)	21
4.7. Apoptosis	22
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
<b>6. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>25</b>
<b>7. HIPÓTESIS</b>	<b>26</b>
<b>8. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>27</b>
8.1. Animales de experimentación	27
8.2. Implantación del glioma C6	27
8.3. Administración del FTe y de Carmustina (BCNU)	27
8.4. Estudios histopatológicos	28
8.5. Análisis estadístico	32

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

<b>9. RESULTADOS</b>	<b>33</b>
<b>9.1. Efecto de la administración de FTe y/o Carmustina (BCNU) en el glioma C6 murino en el Volumen Tumoral</b>	<b>33</b>
<b>9.2. Efecto de la administración de FTe y/o Carmustina (BCNU) en el glioma C6 murino en el grado de necrosis</b>	<b>33</b>
<b>9.3. Efecto de la administración de FTe y/o Carmustina (BCNU) en el glioma C6 murino en el porcentaje de apoptosis</b>	<b>33</b>
<b>10. DISCUSIÓN</b>	<b>41</b>
<b>11. CONCLUSIONES</b>	<b>49</b>
<b>12. REFERENCIAS</b>	<b>50</b>

#### **ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1. Grados de Malignidad</b>	<b>8</b>
<b>Tabla 2. Enfermedades en las que el Factor de Transferencia ha tenido efectos Terapéuticos</b>	<b>18</b>
<b>Tabla 3. Administración de FTe y Carmustina (BCNU)</b>	<b>28</b>
<b>Tabla 4. Criterios para evaluación de necrosis</b>	<b>29</b>
<b>Tabla 5. Resultados TUNEL.</b>	<b>34</b>

#### **ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>FIGURA 1. Clasificación de tumores cerebrales</b>	<b>5</b>
<b>FIGURA 2. Efecto de la administración de FTe y/o Carmustina (BCNU) en el glioma C6 murino en el Volumen Tumoral</b>	<b>35</b>

<b>FIGURA 3.</b> Efecto de la administración de FTe y/o Carmustina (BCNU) en el glioma C6 murino en el grado de necrosis	<b>36</b>
<b>FIGURA 4.</b> Efecto de la administración de FTe y/o Carmustina (BCNU) en el glioma C6 murino en el grado de necrosis	<b>37</b>
<b>FIGURA 5.</b> Efecto de la administración de FTe y/o Carmustina (BCNU) en el glioma C6 murino en el porcentaje de apoptosis	<b>38</b>
<b>FIGURA 6.</b> Porcentaje de apoptosis y morfología de este proceso	<b>39</b>
<b>FIGURA 7.</b> Porcentaje de apoptosis y morfología de este proceso	<b>40</b>

## RESUMEN

El Glioblastoma Multiforme (GBM) es la neoplasia más común del cerebro. Debido a que es un tumor de difícil tratamiento por diversas razones como su localización anatómica, comportamiento biológico, síntomas producidos, etcétera, el pronóstico para los pacientes que lo sufren es reservado, además de que la terapéutica tradicional no ha sido del todo exitosa y en muchas ocasiones demerita la calidad de vida del paciente.

Por tales motivos, en la actualidad, la utilización de la inmunoterapia como coadyuvante en el tratamiento antineoplásico está siendo aplicada y cobra mayor fuerza día con día. Dentro de esta modalidad terapéutica se encuentra el Factor de Transferencia específico (FTe) que ha sido empleado como agente inmunoterápico en enfermedades infecciosas, alergias y padecimientos neoplásicos en humanos, teniendo excelentes resultados sobre todo en las primeras afecciones mencionadas. El objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto del FTe en el desarrollo del Glioma C6 especialmente en el porcentaje de apoptosis, Necrosis y Volumen tumoral.

Se emplearon 40 ratas Wistar, hembras, de 12 semanas de edad y se dividieron en 4 grupos: 1 Control (n=10), 1 con tratamiento clásico (n=10) (Carmustina: BCNU), 1 con FTe (n=10) y 1 con la mezcla de BCNU+FTe (n=10) administrados vía intratumoral (I.T). A todas las ratas se les inoculó el Glioma C6 y una vez que éste alcanzó 1.5cm<sup>3</sup> de diámetro, se comenzó con la terapia.

Se evaluó el aumento del volumen tumoral, porcentaje de apoptosis y grado de necrosis. En los resultados obtenidos, la terapia con Carmustina (BCNU) o FTe+BCNU vía intratumoral, muestran una diferencia en el volumen tumoral ( $p < 0.035$ ) cuando se compara en el grupo Control. En el porcentaje de apoptosis, la terapia con FTe y FTe+BCNU muestra una diferencia significativa de  $p < 0.000207$  y  $p < 0.000929$  respectivamente comparados con el grupo Control.

En el grado de Necrosis, se determinó una diferencia estadísticamente significativa del grupo tratado con FTe y el grupo tratado con Carmustina (BCNU) de  $p < 0.032$  y  $p < 0.017$  respectivamente. El grupo tratado con FTe+BCNU no mostró diferencias con respecto al grupo Control.

Es probable que el Factor de Transferencia específico (FTe) genere un perfil de citocinas (IL-1, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) que coadyuva a la citotoxicidad celular generando Apoptosis y Necrosis <sup>(49, 52)</sup>.

Se concluye que el FTe puede ser utilizado como auxiliar en el tratamiento para el Glioma.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ANOVA</b>	Análisi de Varianza
<b>BCNU</b>	N-N bis (2 cloroetil)- N- nitrosourea
<b>CDR</b>	Regiones determinantes de complementariedad
<b>CMH</b>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
<b>CD4</b>	Linfocitos T auxiliares
<b>CD8</b>	Linfocitos T citotóxicos
<b>DTH</b>	Delayed Type Hypersensitivity (Hipersensibilidad Cutánea Tardía)
<b>FNT-<math>\alpha</math></b>	Factor de Necrosis Tumoral- alfa
<b>FTe</b>	Factor de Transferencia específico
<b>GBM</b>	Glioblastoma Multiforme
<b>GFAP</b>	Proteína Glial Fibrilar Ácida
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>INNN</b>	Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
<b>PPD</b>	Derivado Proteico Purificado
<b>RCI</b>	Respuesta Inmune Celular
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>TCR</b>	Receptor de célula T
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento de endotelio vascular

# 1. INTRODUCCIÓN

## NEOPLASIAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

La incidencia anual de tumores del Sistema Nervioso Central (SNC) oscila entre 10 y 17 por cada 100 000 personas, para los tumores intracraneales, y 1 a 2 por cada 100 000 personas, para los tumores intramedulares; aproximadamente la mitad son tumores primarios y el resto tumores metastásicos <sup>(3, 14, 23)</sup>.

A pesar del pequeño número de tumores cerebrales, en comparación con otros más frecuentes como tumores de colon, pulmón, o mama, entre otros, la morbilidad y mortalidad que causan en la población es altamente significativa <sup>(38, 66)</sup>.

Los tumores del SNC representan el 20% de todos los tumores malignos en la infancia. En los niños menores de 15 años, los tumores del SNC son, después de las leucemias, la segunda causa de muerte debida a cáncer. El 70% de los tumores infantiles del SNC se origina en la fosa posterior, mientras que en el adulto una proporción comparable de tumores se origina en los hemisferios cerebrales por encima del tentorio. En hombres entre 15 y 54 años de edad son la tercera causa de muerte por cáncer, y en mujeres entre 15 y 34 años de edad constituyen la cuarta causa de muerte debida a cáncer. Predomina en el sexo masculino en razón de 2:1, y ataca mayormente a la raza blanca <sup>(38, 66)</sup>.

Las neoplasias del Sistema Nervioso al igual que en los humanos, son comunes en animales domésticos. En perros, éstas ocurren con una frecuencia y variedad similares a las de las personas. Sin embargo, estas neoplasias se han descrito con más frecuencia en perros que en otros animales domésticos <sup>(1, 14, 38, 66)</sup>.

Los perros mayores de dos años de edad en razas braquicefálicas con ancestros comunes (Boxer, Bulldog inglés y Boston Terrier) tienen la incidencia más alta de tumores cerebrales de todos los animales domésticos, y de éstos, son los más

numerosos los tumores gliales (incluidos los Gliomas no clasificados) <sup>(1, 14, 38, 66)</sup>.

Es por esto, que identificar los factores epidemiológicos, clínicos, imagenológicos y de tratamiento que influyen en el pronóstico de estos enfermos debe constituir un punto de partida para lograr que la calidad de vida y el tiempo de supervivencia de los pacientes sea cada vez mayor.

## **1.1. Factores de riesgo ambientales u ocupacionales para neoplasias del Sistema Nervioso Central (SNC).**

Hasta hace poco, el cloruro de vinilo era el único producto químico conocido que estaba directamente relacionado con los tumores cerebrales. Sin embargo, en un estudio reciente, se expone que los altos niveles de exposición al plomo en trabajos como la fundición de plomo, la fabricación de baterías de plomo, la imprenta o la industria química pueden provocar un posible aumento del riesgo de cáncer cerebral. Actualmente se investiga sobre los pesticidas <sup>(7, 14, 23, 38)</sup>.

Por su parte, los estudios acerca de los efectos de los campos electromagnéticos no son todavía claros. En uno de ellos se decía que los hombres en cuyo trabajo están expuestos a campos magnéticos tenían porcentajes más altos de cáncer cerebral, mientras que en otro estudio más reciente no se estableció riesgo alguno entre los trabajadores de la industria de servicio eléctrico <sup>(66)</sup>.

Se ha observado una incidencia por encima de la media de los tumores cerebrales en: trabajadores agrícolas, dentistas, fiscales, personal sanitario, soldadores, trabajadores del metal, vidrio y cerámica.

## **1.2. Causas de los tumores cerebrales.**

**a) Factores genéticos.** Existe un grupo de genes causantes de la proliferación del cáncer (oncogenes), que junto con los genes defectuosos que inhiben los tumores (genes inhibidores de tumores) podrían desempeñar distintos papeles en el proceso que conlleva al cáncer cerebral primario <sup>(14, 66)</sup>.

**b). Anomalías genéticas específicas.** Hay un grupo de tumores cerebrales, como los Glioblastomas, los Astrocitomas anaplásicos y los Meduloblastomas que son el resultado de genes anómalos o de falta de genes:

- ✓ Por ejemplo, investigadores han descubierto un gen defectivo MMAC1 (cáncer avanzado múltiple mutado) en la mayoría de los Glioblastomas (pero no en los de bajo Grado). El gen MMAC1 determina la agresividad del tumor <sup>(14, 66)</sup>.

**c) Factores heredados.** Información genética familiar de grupos estudiados con padecimiento de cáncer cerebral, indica que los factores genéticos desempeñan un papel directo en algunos casos <sup>(14, 66)</sup>.

**d) Posibles causas de defectos congénitos adquiridos.** Aunque parece ser que las malformaciones genéticas tienen importancia en algunos casos, las anomalías genéticas que causan tumores cerebrales no suelen ser hereditarios, pero se producen como resultado de daños en el entorno u otros factores. Los investigadores están estudiando una serie de factores que podrían contribuir a la aparición de tumores cerebrales. Entre éstos se encuentran los siguientes: Desarrollo fetal anormal, Defectos en el sistema inmunológico, Virus, Hormonas, Sustancias químicas, Radiación con iones, Campos electromagnéticos <sup>(14, 66)</sup>.

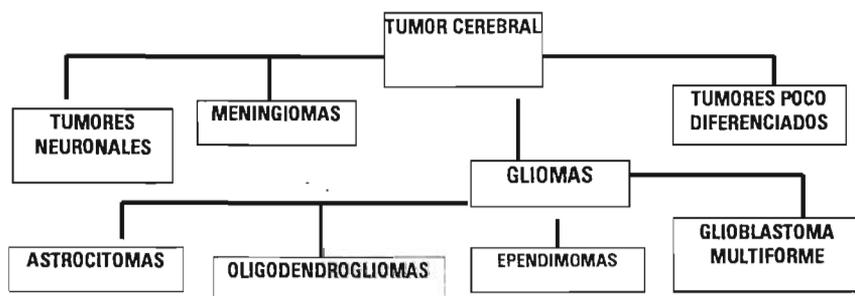
Los tumores cerebrales se clasifican como:

- ✓ Gliomas
- ✓ Tumores neuronales
- ✓ Tumores poco diferenciados
- ✓ Meningiomas <sup>(14, 66)</sup>.

Dentro de los tumores cerebrales, los denominados Gliomas son los más frecuentes y se dividen en Astrocitomas, Oligodendrogliomas y Ependimomas.

Existen varias categorías diferentes de tumores derivados de los Astrocitos, como el Astrocitoma Fibrilar, el Glioblastoma Multiforme (GBM), el Astrocitoma Pilocítico y el Xantastrocitoma pleomórfico, entre otros. Estos tumores presentan características histológicas típicas, zonas de localización preferente en el encéfalo, grupos de edad con afectación típica y una evolución clínica relativamente característica <sup>(6, 14)</sup>. En la Figura 1 se puede apreciar la clasificación de los tumores del SNC.

**Figura 1. Clasificación de tumores cerebrales.**



## 2. CARACTERÍSTICAS DEL GLIOBLASTOMA MULTIFORME (GBM)

### 2.1. Clasificación del Glioblastoma Multiforme (GBM) según el tipo celular y localización anatómica.

Cerca de la mitad de todos los tumores cerebrales primarios surgen de células gliales, que suelen formar el tejido conectivo o de soporte del Sistema Nervioso Central. Existen diferentes tipos de células gliales: astrocitos; células que forman la oligodendroglia; las células ependimales y las de la microglia. Cuando las células gliales se vuelven malignas a partir de la transformación neoplásica de astrocitos maduros <sup>(6, 53)</sup> reciben en conjunto el nombre de Gliomas. Algunos Gliomas comunes incluyen los siguientes:

1. Astrocitomas (Astrocitos)
2. Ependimomas (Células ependimales que recubren los ventrículos cerebrales y canal central medular)
3. Oligodendrogliomas (Oligodendrocitos, células que rodean a las células nerviosas)
4. Gliomas Mixtos (Contienen tanto Oligodendrocitos como Astrocitos)
5. Usualmente el **Glioblastoma Multiforme** (Astrocitos maduros) suele localizarse en los hemisferios cerebrales, Cerebelo, Pedúnculo Cerebral o en la Médula Espinal.

Estos tumores representan aproximadamente el 80% de los tumores cerebrales primarios del adulto principalmente en pacientes entre el 4º y el 6º decenios de la vida <sup>(6, 14, 66)</sup>.

### 2.2. Morfología del Glioblastoma Multiforme (GBM).

El aspecto **Macroscópico** es el de un tumor que aparece parcialmente

delimitado del tejido cerebral adyacente; siempre existe infiltración más allá de su borde externo. El tamaño de estos tumores oscila entre unos pocos centímetros y lesiones masivas que sustituyen a todo un hemisferio. Las variaciones en el aspecto macroscópico del tumor en cada región del mismo son características. Algunas áreas son duras y blanquecinas, mientras que otras son blandas y amarillas (debido a la necrosis tisular), y otras presentan degeneración quística y hemorragia <sup>(6, 38, 66)</sup>.

En el estudio **Microscópico**, el GBM se caracteriza por presentar necrosis con un patrón en serpentina, y se observa en zonas de células tumorales muy atípicas agrupadas a lo largo de los bordes de las regiones necróticas, dando lugar a un patrón histológico que se ha denominado en pseudoempalizada <sup>(38, 53)</sup>. Muestra alta celularidad, pleomorfismo y un elevado índice mitótico; aunque estas características pueden variar según el grado de diferenciación del Glioblastoma Multiforme <sup>(53)</sup>.

Se caracteriza por presentar células con citoplasmas desde redondeados hasta fusiformes, con bordes citoplasmáticos poco definidos, con aspecto denso o laxo aunque pueden expresar Proteína Glial Fibrilar Ácida (GFAP) <sup>(6, 38, 66)</sup>. Se observa un incremento leve o moderado en la densidad de núcleos gliales, se observan hipercromáticos e irregulares además de pleomorfismo nuclear variable y una trama de prolongaciones astrocitarias con positividad para Proteína Glial Fibrilar Ácida (GFAP) que hace que el fondo del tumor tenga un aspecto fibrilar. La transición entre el tejido neoplásico y el tejido normal es indistinguible, y se pueden observar células tumorales infiltrando el tejido normal a cierta distancia de la lesión principal <sup>(6, 38, 66)</sup>.

Presentan algunas células en mitosis y proliferación vascular o de células endoteliales en forma de ovillos, estas células aglomeradas protruyen en la luz vascular. Este fenómeno se ha asociado al factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) que es producido por los astrocitos malignos y que genera respuesta a la hipoxia <sup>(6, 23, 38, 53, 66)</sup>.

Adicionalmente pueden mostrar células gigantes multinucleadas de aspecto bizarro y células muy anaplásicas pequeñas; este último patrón morfológico tiende a predominar en los cuadros recurrentes <sup>(53)</sup>.

Los esquemas de grado histológico en los Astrocitomas fibrilares tienen utilidad clínica para establecer el pronóstico y aplicar las opciones terapéuticas. <sup>(14)</sup>

Los grados de malignidad se determinan con base en las características microscópicas y se pueden apreciar en la Tabla 1:

**Tabla 1: Grados de malignidad del Glioblastoma Multiforme (GBM).**

✓ Neoplasia Astrocítica Grado I	No presenta atipia nuclear (hipercromasia, anisocariosis y pleomorfismo), figuras mitóticas, proliferación endotelial y focos de necrosis coagulativa
✓ Neoplasia Astrocítica Grado II	Presenta tan sólo una de estas características.
✓ Neoplasia Astrocítica Grado III	Presenta dos de estas características.
✓ Neoplasia Astrocítica Grado IV	Muestra tres o todas las características anteriormente descritas.

(Según lineamiento del Esquema de Daumas- Duport) <sup>(17)</sup>.

El Glioblastoma Multiforme se considera un Astrocitoma Grado IV <sup>(17)</sup>.

### **2.3. Progresión tumoral del Glioblastoma Multiforme (GBM).**

En la progresión de los Astrocitomas hacia mayores grados de malignidad se produce una serie de cambios fenotípicos difusos, continuos en el tiempo, que suelen ser un aumento en el grado de atipia nuclear y de actividad mitótica. En el Glioblastoma Multiforme, es frecuente la aparición de focos necróticos y proliferación microvascular (angiogénesis) <sup>(6, 66)</sup>.

El GBM como algunos otros tumores gliales con características histológicas benignas, incluyendo una baja frecuencia de mitosis, uniformidad celular y crecimiento lento, pueden infiltrar grandes regiones del encéfalo, causando déficit clínicos graves y un muy mal pronóstico. La capacidad de extirpar quirúrgicamente este tumor glial infiltrante sin comprometer la función neurológica es limitada <sup>(5, 6, 10, 66)</sup>

La localización anatómica del tumor puede tener consecuencias mortales con independencia de su clasificación histológica. El patrón de diseminación del GBM es diferente del que presentan otros tumores, incluso los Gliomas más malignos no suelen causar metástasis fuera del SNC <sup>(5, 14, 66)</sup>.

El espacio subaracnoideo constituye una vía para la diseminación de tumores primarios del SNC, de manera que los tumores muy anaplásicos y también los bien diferenciados pueden diseminarse en el encéfalo y la médula espinal causando metástasis cuando alcanzan las vías del líquido cefalorraquídeo (LCR). Esta clase de tumores, salvo casos muy excepcionales, no dan metástasis fuera del Sistema Nervioso Central <sup>(1, 5, 6, 10, 14)</sup>.

Para explicar este hecho se han aducido, entre otras razones, la ausencia de vasos linfáticos en el Sistema Nervioso Central y entre éste y los demás órganos, y la rareza de invasión vascular sanguínea por parte de un tumor neuroepitelial <sup>(1, 5, 6, 10, 14, 66)</sup>.

#### **2.4. Síntomas causados por Glioblastoma Multiforme (GBM).**

Aparición súbita y empeoramiento rápido de síntomas que incluyen dolor de cabeza, ataques, pérdida de memoria o cambios de comportamiento <sup>(66)</sup>.

## 2.5. Diagnóstico de Glioblastoma Multiforme (GBM).

**a). Examen neurológico.** Normalmente, la primera prueba que se lleva a cabo cuando un paciente se queja de síntomas propios del tumor cerebral es un examen neurológico. Éste incluye la exploración de los movimientos oculares, del oído, de la sensibilidad, del movimiento muscular, del sentido del olfato, del equilibrio y, por último, de la coordinación. El médico también examina el estado mental y la memoria del paciente <sup>(1, 5, 10, 17, 66)</sup>.

### **b). Técnicas de imagen:**

- ✓ *Resonancia magnética.*
- ✓ *Tomografía computarizada.*
- ✓ *Tomografía por emisión de positrones (PET)*
- ✓ *Otras técnicas de imagen .* Escaneo con magnetoencefalografía (MEG), Punción lumbar (se detectarían células en en líquido cefalorraquídeo), Biopsia <sup>(1, 5, 10, 17, 66)</sup>

## 2.6. Determinación del pronóstico de supervivencia de pacientes con Glioblastoma Multiforme (GBM).

Los porcentajes de supervivencia de pacientes con GBM dependen de distintos factores:

- ✓ Grado tumoral, la tendencia a extenderse y la capacidad de crecimiento.
- ✓ Localización del tumor (La localización implica si el tumor se puede eliminar o no con cirugía).

- ✓ Edad del paciente. El pronóstico es peor en los pacientes muy jóvenes y en los muy mayores, aunque los pacientes más jóvenes que sobreviven dos años tras el diagnóstico tiene mucho mejor pronóstico que los ancianos.
- ✓ Capacidad funcional del paciente.
- ✓ Duración de los síntomas <sup>(1, 5, 10, 17, 38)</sup>.

No hay relación estadísticamente significativa entre el grado de resección quirúrgica y el tiempo de sobrevida. Tampoco entre el diagnóstico histológico y la supervivencia. La aplicación de radioterapia y quimioterapia posterior a la cirugía influye de forma significativa en el incremento del tiempo de supervivencia. En general, el grado de malignidad histológica de este tumor neuroepitelial se estima en función de cinco variables: heterotipia celular, mitosis, celularidad, necrosis y proliferación vascular <sup>(1, 5, 10, 17, 38)</sup>.

Se distinguen cuatro grados, a los que se les ha intentado asociar una determinada significación pronóstica, ésta se expresa en tiempo de sobrevida desde el momento de hacer el diagnóstico en casos con eventual resección quirúrgica, pero sin radioterapia ni quimioterapia <sup>(5, 6, 10, 17, 38)</sup>

- ✓ **Grado I:** sobrevida de 5 años o más; eventual curación.
- ✓ **Grado II:** sobrevida de 3 a 5 años.

Las células tumorales de bajo Grado (I y II) están bien definidas y tienen una forma casi normal. Los tumores de bajo Grado suelen tener un índice más alto de supervivencia que los de alto Grado. Sin embargo, esto no siempre se cumple. Por ejemplo, algunos Gliomas de bajo Grado (II) tienen un riesgo muy elevado de progresar <sup>(6, 10, 17, 38)</sup>

- ✓ **Grado III:** sobrevida de 1 a 3 años.
- ✓ **Grado IV:** sobrevida de menos de 1 año.

Células tumorales de alto Grado (III y IV) tienen formas anómalas y son más difusas, lo que indica un comportamiento más agresivo. (Habitualmente requieren cirugía, radioterapia, quimioterapia, y posiblemente tratamientos en investigación) <sup>(1, 5, 6, 10, 17, 23, 38)</sup>

Los tumores formados por células de diferentes tipos, generalmente se clasifican según las células que existan de mayor Grado de malignidad, incluso aunque sean muy escasas <sup>(1, 5, 6, 10, 17, 23, 38)</sup>.

Por estas razones, las pruebas clínicas están diseñadas para encontrar mejores maneras de tratar a los pacientes con cáncer y se basan en la información más actualizada. Identificar los factores epidemiológicos, clínicos, imagenológicos y de tratamiento que influyen en el pronóstico de estos enfermos debe constituir un punto de partida para lograr que la calidad de vida y el tiempo de supervivencia de los pacientes sea cada vez mayor.

### **3. TERAPÉUTICA CONVENCIONAL PARA GLIOBLASTOMA MULTIFORME (GBM)**

El objetivo del tratamiento del GBM, es reducir en lo posible el tumor mediante cirugía, radioterapia, quimioterapia, o tratamientos en investigación. Estos tratamientos se aplican solos o, más frecuentemente, en combinación <sup>(66)</sup>

El Tratamiento específico para el GBM se basa en el principio de la citorreducción, empleando un abordaje multimodal que incluya cirugía, radioterapia (utiliza rayos externos dirigidos directamente al tumor) que suele empezar una semana después de la intervención quirúrgica y se aplica 5 días a la semana durante 6 semanas, y quimioterapia. El paso inicial consistirá en la resección quirúrgica de la mayor cantidad posible del tumor, en la medida en que resulte segura desde el punto de vista neurológico para el paciente <sup>(5, 10, 67)</sup>.

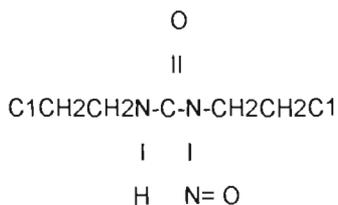
Después de la operación, los pacientes deben recibir radioterapia a una dosis tumoral completa de 60 Gy\* (6.000 rad.) También debe realizarse quimioterapia con una nitrosourea: CARMUSTINA (BCNU), 200 mg/m<sup>2</sup> I.V. c/6-8 hrs o con LOMUSTINA (CCNU), 130 mg/m<sup>2</sup> P.O. c/6-8 horas <sup>(5, 10)</sup>.

\*Gy (Gray): cantidad de energía absorbida por cualquier tejido o sustancia tras la exposición a radiaciones y se aplica a todos los tipos de radiación. Un Gy equivale a 100 rad.

#### **3.1. Carmustina (BCNU).**

La Carmustina (BCNU) es una cloroetil nitrosourea y es el agente anticancerígeno más utilizado para el tratamiento del GBM <sup>(5, 7, 9, 10, 29)</sup>.

La N-N bis (2-cloroetil)-N- nitrosourea (BCNU) tiene un peso molecular de 214.06g y su fórmula estructural es:



Actúa inhibiendo la reparación del ADN y altera la maduración del ARN.

La Carmustina es un medicamento empleado para tratar algunos tipos de cáncer. Es activa contra Linfoma de Hodgkin y no Hodgkin, Mieloma múltiple y Carcinoma gastrointestinal <sup>(14, 27, 44)</sup>.

Dada su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica, ha sido empleada en la Leucemia meníngea y en tumores primarios y metastásicos del cerebro, con resultados promisorios <sup>(9)</sup> Se ha reportado acerca de respuestas beneficiosas en Carcinoma mamario, Carcinoma broncogénico y Carcinoma de células renales <sup>(9)</sup> en regímenes con altas dosis, en asociación con trasplantes de Médula Ósea; ha demostrado también actividad contra Melanoma, Cáncer de pulmón y Cáncer de colon <sup>(8, 45)</sup>. A pesar de todo esto, existe un alto porcentaje de recidiva y el tumor se vuelve refractario al químico después de haberlo utilizado por tiempo prolongado. Además sólo garantiza un 70% de respuesta.

### **3.2. Efectos secundarios de la quimioterapia con Carmustina (BCNU).**

Como los fármacos quimioterápicos pueden afectar también células normales, los efectos secundarios son comunes. Para ayudar a contrarrestar estos efectos, se

administra la quimioterapia intermitente durante un periodo previsto que permite que las células normales se recuperen entre los tratamientos. Los efectos secundarios incluyen náuseas, vómitos, fatiga, infecciones, hemorragias y pérdida de cabello <sup>(1, 5, 8, 10, 14, 27, 28, 44, 45, 66)</sup>. Además de provocar alveolitis fibrosante, neumonitis intersticial, insuficiencia renal, neuritis óptica, leucoencefalopatía y mielosupresión <sup>(1, 5, 8, 10, 14, 27, 44, 45, 66)</sup>.

### **3.3. Consecuencias a largo plazo en los pacientes que sobreviven.**

Además de los problemas de toxicidad inmediata, los tratamientos pueden tener efectos a largo plazo en los pacientes que sobreviven. Uno de ellos, por ejemplo, es el aumento del riesgo de tumores del Sistema Nervioso Central así como de otros tumores, incluyendo el Linfoma no Hodgkin y el Melanoma, tras el tratamiento sea con cirugía o con radioterapia. Otros efectos a largo plazo quedan encubiertos por otros tratamientos específicos <sup>(5, 9, 66)</sup>.

#### 4. FÁRMACOS EN INVESTIGACIÓN PARA SER UTILIZADOS EN TRATAMIENTOS DE TUMORES CEREBRALES

Una serie de fármacos que se dirigen a mecanismos específicos asociados con el cáncer cerebral están investigándose. Las combinaciones de algunos de estos fármacos con o sin quimioterapia estándar pueden resultar ser más eficaces que el uso de cualquier tratamiento solo <sup>(5, 9, 18, 19, 41, 66)</sup>.

Debería destacarse que ninguno de estos fármacos en este momento constituye una cura, aunque algunos están mejorando la supervivencia:

1. *Anticuerpos monoclonales* <sup>(41)</sup>.
2. *Interleucina e Interferón* <sup>(18, 19, 39)</sup>.
3. *Vacunas contra los tumores* <sup>(5, 25, 66)</sup>.
4. *Linfocitos T* <sup>(5, 25, 66)</sup>.
5. ***Inmunoterapia*** <sup>(5, 25, 64)</sup>.

##### **4.1. Inmunoterapia.**

Actualmente se realizan ensayos clínicos con terapia biológica para tratar de que el cuerpo combata al cáncer. En esta terapia se emplean materiales producidos por el cuerpo o fabricados en un laboratorio para impulsar, dirigir o restaurar las defensas naturales del cuerpo contra la enfermedad <sup>(5, 66)</sup>.

La terapia biológica también se conoce con el nombre de terapia modificadora de la respuesta biológica o **inmunoterapia** <sup>(5, 61, 64, 65, 66)</sup>.

Ésta abarca la utilización del **Factor de Transferencia específico (FTe)** que ha demostrado extraordinarios efectos inmunoestimuladores en la involución de ciertos

padecimientos infecciosos, inmunomediados, asociados a hipersensibilidad y algunas neoplasias malignas. En este último grupo, el FTe ha contribuido a mantener a los pacientes libres de enfermedad recidivante o metastásica <sup>(21)</sup>.

#### **4.2. Factor de Transferencia Específico (FTe).**

El FTe es un producto derivado de los glóbulos blancos de la sangre, y se considera que una unidad de FTe es el producto que se obtiene de los linfocitos de medio litro de sangre <sup>(36)</sup>. El FTe es una molécula de bajo peso molecular que se estima alrededor de 5000 Daltones <sup>(55)</sup>; es lábil en presencia de calor, pero muy estable a bajas temperaturas, lo que permite su almacenamiento por largos periodos de tiempo (meses o años) a -20°C y -70°C <sup>(20)</sup>.

Además existe una interacción única y específica entre el FTe y el antígeno que fue utilizado para inducirlo. Este FTe se obtiene en esterilidad estricta; y una vez que los leucocitos han sido lisados, se hace un extracto que luego es sometido a una diálisis extensa y el producto resultante que pasó por la membrana de diálisis es lo que constituye el FTe, el cual puede ser liofilizado <sup>(20)</sup>. El FTe se ha utilizado clínicamente como un agente inmunoproláctico o inmunomodulador en diferentes padecimientos, datos que se resumen en la Tabla 2:

#### **4.3. Enfermedades en las que el Factor de Transferencia ha tenido efectos terapéuticos.**

Tabla 2.

1. INMUNODEFICIENCIAS SEVERAS	
<b>A). DEFECTOS CONGÉNITOS</b>	
◆	Síndrome de Wiskott- Aldrich
◆	Ataxia telangiectásica
◆	Síndrome de Inmunodeficiencia Severa Combinada
◆	Síndrome parcial de Di Gorge
◆	Disgammaglobulinemia con defectos en inmunidad celular

2. ENFERMEDADES INFECCIOSAS	
<b>A. MICÓTICAS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Candidiasis mucocutánea crónica</li> <li>◆ Histoplasmosis diseminada</li> <li>◆ Coccidioidomicosis diseminada</li> </ul>
<b>B. VIRALES</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Citomegalovirus</li> <li>◆ Herpes zoster</li> <li>◆ Sarampión</li> </ul>
<b>C. MICOBACTERIAS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Tuberculosis</li> <li>◆ Lepra</li> <li>◆ <i>Mycobacterium fortuitum</i></li> </ul>
<b>D. PROTOZOARIOS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Leishmaniasis cutánea</li> <li>◆ Toxoplasmosis</li> </ul>
3. CÁNCER	
◆ Osteosarcoma	◆ Carcinoma nasofaríngeo
◆ Hipernefroma	◆ Carcinoma renal
◆ Cáncer de mama	◆ Carcinoma prostático

<b>4. ENFERMEDADES AUTOINMUNES</b>
◆ No órgano específicas
◆ Lupus eritematoso crónico discoide
◆ Síndrome de Behcet

(25)

Los efectos notables del FTe son en el área de oncología, donde ha contribuido a mantener al paciente libre de enfermedad recidivante o metastásica <sup>(50)</sup>. Ejemplo de esto son los carcinomas prostáticos tanto en su sitio primario como en focos metastásicos. En estos carcinomas se ha evidenciado desde remisión total de la neoplasia, hasta limitar la metástasis del carcinoma <sup>(13)</sup>. Siendo también eficiente en el caso de carcinoma renal, nasofaríngeo y pulmonar <sup>(16, 48, 51)</sup>

El FTe se administra por vía oral o parenteral, pues la mayoría de los investigadores no han encontrado diferencias significativas en la eficacia de FTe según la vía de administración. Pudiendo encontrarse comercialmente en forma de tabletas, cápsulas, solución o liofilizado. Su costo es relativo, aunque en México se expende a un costo menor que en otros países del mundo. Con la ventaja de que hasta el momento no se han reportado efectos adversos post administración. En los inicios de este nuevo siglo aún no se sabe del todo cual es su naturaleza química y cual es su mecanismo de acción. De lo único que se tiene certeza es del profundo efecto biológico que en muchos de los casos contribuye a la mejoría o a la resolución de las patologías <sup>(33, 35, 37, 46)</sup>.

#### **4.4. Estructura química del Factor de Transferencia Especifico (FTe).**

Los investigadores han intentado por más de veinte años identificar la naturaleza química del compuesto activo del FTe; se ha investigado que el FTe es de naturaleza proteica y químicamente resistente a la ARNasa, ADNasa y a diferentes proteasas <sup>(21, 30)</sup>.

En abril del 2000, Rozzo y Kirkpatrick mediante el uso de cromatografía líquida de alta resolución, pudieron determinar una secuencia conservada de aminoácidos (LLYAQDLVEDN) en siete FTe provenientes de diferentes especies. Este hallazgo sugiere que estos péptidos pueden representar la porción del FTe que se une a las células blanco <sup>(30)</sup>.

#### **4.5. Especificidad del Factor de Transferencia Específico (FTe).**

Posiblemente una de las características más importantes y controversiales del FTe, sea que muestra especificidad que está dada por los antígenos utilizados para inmunizar al donador, o en forma más general con los antígenos que ha tenido contacto. Lo anterior fue propuesto posterior a la realización de experimentos con antígenos sintéticos y microbianos <sup>(31, 32)</sup>.

La mayoría de los receptores no inmunes, adquieren Respuesta Inmune Celular (RCI) demostrable por Hipersensibilidad Cutánea Tardía (*DTH, del inglés Delayed Type Hypersensitivity*) a la mayoría de los antígenos a los que los donadores responden, pero existen algunos antígenos a los que no responden. Aún más difícil de entender es la adquisición de una respuesta en el receptor no inmune, a un antígeno al cual el donador da una respuesta negativa <sup>(31, 32)</sup>.

En estos experimentos se utilizaron grupos de ratones que se inmunizaron con diferentes antígenos, de cada grupo se preparó FTe, con extracto dializado de esplenocitos y éste se utilizó para sensibilizar a ratones vírgenes. Posterior a 24 horas los animales tratados fueron desafiados con los diferentes antígenos que se emplearon. De esta manera, los ratones receptores sólo reaccionaron a los antígenos con los que el donador había sido previamente inmunizado <sup>(47, 64)</sup>.

Los controles que se utilizaron en este experimento fueron ratones que recibieron FTe provenientes de animales no inmunizados, debido a ello estos animales

no presentaron DTH para ningún antígeno, por lo que la actividad sólo de adyuvante del FTe quedó plenamente descartada <sup>(47, 64)</sup>.

#### **4.6. Mecanismo de acción del Factor de Transferencia Específico (FTe).**

Aunque el mecanismo de acción exacto no se conoce, se han propuesto varias hipótesis para explicarlo:

Una de estas hipótesis sugiere que el FTe forma parte del Receptor de Célula T (TCR), si esto es cierto, entonces el FTe sería necesario para la activación de los Linfocitos T cooperadores (CD4), ya que la activación se efectúa al unirse el antígeno a las moléculas clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH-II) de las células presentadoras de antígeno. Es decir, el FTe se une exclusivamente a los receptores de células previamente inmunizadas con el mismo antígeno (FTe de PPD sólo se une a PPD) <sup>(34, 64)</sup>.

Otra de las hipótesis menciona que el FTe tiene la particularidad de quitar el bloqueo o represión existente en los linfocitos T los cuales son responsables de la inmunidad celular, por lo tanto de modular la misma. Ambas hipótesis aún no han sido comprobadas, faltando realizar más experimentos, por lo tanto, queda todavía por explicarse de qué manera se puede transferir la inmunidad a un receptor previamente no responsivo, en una forma totalmente específica <sup>(20)</sup>.

Lo que sí es un hecho, es que el FTe es un estimulante de la inmunidad celular, es decir, induce la producción de células T funcionales, específicamente linfocitos T CD4 y linfocitos T CD8.

Cuando un linfocito T CD8 reconoce a una célula que expresa un antígeno endógeno, establece una respuesta que culmina en la apoptosis de la célula que presenta el antígeno. Por consiguiente, esos linfocitos se denominan células T

citotóxicas. Su función en la defensa del organismo consiste en destruir a las células extrañas o alteradas, como las células cancerosas. Si bien existen señales específicas que estimulan la apoptosis de la mayor parte de las células, la célula T citotóxica (CD8) tiene la capacidad de inducir apoptosis en cualquier célula que reconozca <sup>(14, 64)</sup>.

También las células CD4 (cooperadoras) inducen la muerte de la célula tumoral dependiendo de la proteína que se exprese en la superficie de la célula presentadora producto del agente oncógeno procesado <sup>(14, 64)</sup>.

#### **4.7. Apoptosis.**

La Apoptosis es una forma de muerte celular cuyo objetivo es el de eliminar las células del huésped que ya no son necesarias a través de la activación de una serie coordinada y programada de acontecimientos internos. Los siguientes rasgos morfológicos, caracterizan a las células que sufren apoptosis:

- a) Constricción Celular
- b) Condensación de la cromatina
- c) Formación de vesículas citoplasmáticas y cuerpos apoptóticos
- d) Fagocitosis de las células o cuerpos apoptóticos <sup>(14, 21, 64)</sup>.

Debido a que dentro de las células apoptóticas se dan alteraciones químicas específicas, el reconocimiento precoz de éstas por los macrófagos y células circundantes se produce sin liberación de componentes proinflamatorios. De esta manera la respuesta apoptótica permite eliminar las células con un compromiso mínimo del tejido adyacente <sup>(14, 21, 64)</sup>.

Por lo anterior, el utilizar fármacos que induzcan apoptosis es de vital importancia en pacientes que padecen Glioblastoma Multiforme ya que como vimos, las opciones terapéuticas utilizadas hasta el momento causan daños secundarios severos que

aunque en efecto tienen resultados positivos no contemplan la calidad de vida del paciente mientras son sometidos a estas terapias <sup>(14, 21, 64, 66)</sup>.

## **5. OBJETIVOS**

❖ **General:** Valorar el papel terapéutico del Factor de Transferencia Especifico (FTE) en el glioma C6 murino.

❖ **Específicos:** A través de métodos histológicos se evaluará:

El porcentaje de apoptosis mediante el uso de inmunohistoquímica empleando la técnica de TUNEL <sup>(2)</sup>.

## **6. JUSTIFICACIÓN**

Los diferentes protocolos terapéuticos para el Glioblastoma Multiforme (GBM) hasta el momento han sido poco alentadores, ya que la tasa de supervivencia postquirúrgica ha sido relativamente corta: el 41% de los pacientes sobreviven menos de un año; 39% entre 1 y 2 años; 12% entre 2 y 3 años y sólo un 8% sobreviven más de tres años. Por lo que es una necesidad prioritaria hoy en día implantar una terapia que disminuya drásticamente el volumen tumoral, que limite la expansión tumoral y elimine la posibilidad de recidiva, pero sobre todo que no demerite la calidad de vida de los pacientes (como sucede con la radio y quimioterapia) y por ende ofrezca un periodo de supervivencia más amplio y aún más, que vislumbre la posibilidad de remisión total de la neoplasia.

## **7. HIPÓTESIS**

El Factor de Transferencia Específico (FTe) es un agente inmunomodulador que incrementa notablemente la eficiencia de la inmunidad celular. Por lo que el uso del FTe en el glioma C6 murino puede inducir muerte celular, sin efectos adversos en el resto del organismo.

## **8. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **8.1. Animales de experimentación.**

Se utilizaron 40 ratas Wistar hembras de 12 semanas de edad, las cuales se mantuvieron en el bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) durante el transcurso del experimento, ubicadas en jaulas convencionales para esta especie, alimentadas con concentrado comercial para roedores y agua *ad libitum*.

### **8.2. Implantación del Glioma C6.**

Las células del glioma C6 se obtuvieron de la "American Tissue Culture Colection (Rockville, Maryland, U.S.A.)". Estas células se cultivaron en condiciones de esterilidad en medio Ham's F- 10 suplementado con 2.5% de suero fetal bovino y 15% de suero equino. Se inocularon vía subcutánea  $1 \times 10^7$  células C6 en ratas Wistar de 12 semanas de edad para obtener una amplia fuente de células C6. Al cabo de 20 días, las formaciones tumorales fueron extirpadas y se disociaron mecánicamente a 4°C en solución salina fisiológica y se ajustaron a una concentración de  $1 \times 10^7$  en 500  $\mu$ l.

Posteriormente se les inocularon 500  $\mu$ l de esta solución vía subcutánea en el miembro posterior derecho de las ratas. En un lapso entre 19 y 21 días se esperó a que el 80% de los animales inoculados desarrollaran el tumor y que éste alcanzara un diámetro de 1.5 cm, con el cual, la posibilidad de reabsorción tumoral es mínima <sup>(3, 42)</sup>. Entonces se procedió a iniciar el experimento.

### **8.3. Administración de FTe y Carmustina (BCNU).**

a). Una vez que las tumoraciones alcanzaron las dimensiones requeridas, y después de integrar los diferentes grupos de estudio que constan de 10 animales cada uno, se administró de acuerdo a lo mostrado en la tabla 3:

**Tabla 3.**

✓ Grupo Control	1ml Agua inyectable. Vía Intra Tumoral (I.T.). Dosis única
✓ Grupo al que se administrará FTe	1ml FTe (*1U FTe) Vía IT. Dosis única. <sup>(46, 48, 52)</sup> .
✓ Grupo al que se administrará BCNU	14 mg/ Kg. Dosis semanal. Durante 3 semanas. (3 dosis total)
✓ Grupo al que se administrará FTe + BCNU	1ml FTe. Vía IT. Dosis única + 14mg/Kg BCNU Dosis semanal. Por tres semanas.

\*1 UFTe= cantidad de FTe obtenido de  $6 \times 10^4$  células T.

b). Se determinó el volumen ( $\text{cm}^3$ ) tumoral utilizando la fórmula  $6/ \pi \times L \times W \times H$  descrita por Tamayko y Reynolds <sup>(61)</sup>. En donde L= largo, W= ancho y H= alto.

#### **8.4. Estudios Histopatológicos.**

a). Todos los fragmentos del tumor recolectados para este fin se fijaron en una solución bufferada de formol al 10% en un periodo no mayor de 24 horas.

b). Los tejidos se incluyeron en parafina y se procesaron por la técnica rutinaria de Hematoxilina-Eosina para la cuantificación de necrosis.

c). Los criterios que se emplearon para la evaluación del grado de necrosis fueron con base a los parámetros mostrados en la tabla 4:

**Tabla 4.**

<b>Porcentaje de Necrosis</b>	<b>Valor</b>
Nula	0
Menos de 25%	1
De 25 a 50%	2
De 50 a 75%	3
Más de 75%	4

Se contaron en el microscopio 10 campos por laminilla a 400x. Se contabilizaron todas las células C6 que aparecieron por campo y estas se consideraron como el 100%. Se identificaron las células en necrosis utilizando los criterios expuestos por Cotran <sup>(14)</sup> asignándoles una equivalencia numérica de cero a 4 (Tabla 3).

**d).** Para la cuantificación de apoptosis se emplearon estudios de inmunohistoquímica utilizando la técnica de TUNEL desarrollada con: *In Situ Cell Death Detection Kit, AP*. Se eligieron 5 laminillas al azar por grupo para realizar este estudio.

## TÉCNICA DE TUNEL PARA DETECCIÓN DE APOPTOSIS (Roche)

### (TdT- mediated dUTP-biotin nick end- labeling)

Kit for immunohistochemical detection and quantification of apoptosis (programmed cell death) at single cell level, based on labeling of DNA strand breaks (TUNEL technology): Analysis by light microscopy. De laboratorio Roche <sup>(2)</sup>. (Kit para la detección de muerte celular *in situ*. Técnica inmunohistoquímica para la cuantificación de apoptosis (muerte celular programada) a un nivel celular único, basado en el señalamiento de la ruptura de los filamentos del ADN. Análisis por microscopía óptica).

- |   |   |
|---|---|
| 1. Colocar las laminillas en la platina                                     | 20 minutos (tº entre el 6 y 7)  |
| 2. Desparafinar (con xiloles)   | Xilol 1 (10 minutos)<br>Xilol 2 (10 minutos)<br>Xilol 3 (10 minutos)  |
| 3. Hidratar (con alcoholes)   | Alcohol 100% (8 minutos/3 veces)<br>Alcohol 96º (7 minutos/2 veces)<br>Alcohol 70º (5 minutos/2 veces)                                |
| 4. Lavados con PBS  | 2 lavados/3 minutos c/u/<br>10x   |
| 5. Digestión con Proteinasa K (dilución 1:1000)                             | 200 mcl x laminilla /20 minutos/ 37ºC.  |
| 6. Lavados con PBS  | 2 lavados/ 3 minutos c/u /10x   |
| 7. Mezcla de TUNEL  | Incubar 1 hora/ 37ºC<br>Tubo 1: 5 microlitros (µl)<br>Tubo 2: 45 microlitros<br>(50mcl si es una laminilla/<br>100 mcl si son dobles) |
| Total= 50 microlitros por laminilla   |   |
| Se mezclan y se reconstituyen antes de colocar la mezcla en las laminillas. |   |
| 8. Lavados con PBS  | 3 lavados/1 minuto c/u /10x   |
| 9. Solución reveladora (Anti FITC) αFITC                                    | 60 microlitros x laminilla/   |

- (120 mcl x dos (AP) (Frasquito No. 3 del Kit TUNEL) laminillas)/Incubar 30 minutos 37°C
10. Lavados con PBS 3 lavados/1 minuto c/u /10x
11. Cromógeno Rojo Rápido (Roche) 200 mcl por laminilla/ Incubar 20 a 30 minutos a 37°C

**Todo lo anterior se hace en CÁMARA HÚMEDA.**

12. Lavado con PBS 3 lavados/ 1 minuto c/u/ 10x
13. Contrateñir. Con Hematoxilina Sumergir en Hematoxilina 30 segundos/lavar con agua corriente/ sumergir las laminillas en agua amoniacal y sacar a los 10 seg (para virar el color del núcleo de púrpura a azul) y posteriormente se da un pase por agua corriente.
14. Montar Preparado de Grenetina

Se contaron en el microscopio 10 campos por laminilla a 400x. Se contabilizaron todas las células C6 que aparecieron por campo y éstas se consideraron como el 100%. De este porcentaje se diferenciaron las células que mostraron positividad a la reacción, asignándoles así el porcentaje correspondiente.

#### **8.5. Análisis Estadístico.**

Los resultados de volumen tumoral se analizaron con el método de comparación de ANOVA, seguido de la prueba de Duncan y Tukey.

Los resultados de apoptosis y necrosis se analizaron a través del método de comparación de Kruskal- Wallis.

Todos ellos a través del programa Estadística para Windows versión 5.0.

## **9. RESULTADOS**

### **9.1. Efecto de la administración de FTe y/o Carmustina (BCNU) en el Glioma C6 murino en el volumen tumoral.**

En la figura 2, se presenta la comparación del volumen medio del tumor en ratas experimentales. El nivel de significancia determinó una diferencia estadística del grupo tratado con FTe+BCNU (n=10) y el grupo tratado con BCNU (n=10) de  $p<0.005$  y  $p<0.04$  respectivamente con relación al grupo control. La reducción en el volumen del tumor después del tratamiento, muestra una diferencia significativa de  $p<0.035$  entre grupos, destacando el grupo tratado con la mezcla de FTe+BCNU que como se puede apreciar es el que menor crecimiento desarrolló.

### **9.2. Efecto de la administración de FTe y/o Carmustina (BCNU) en el Glioma C6 murino en el grado de necrosis.**

En las figuras 3 y 4 se muestran las imágenes del grado de necrosis en los cortes histológicos. El nivel de significancia determinó una diferencia estadísticamente significativa del grupo tratado con FTe (n=10) y el grupo tratado con BCNU (n=10) de  $p<0.032$  y  $p<0.017$  respectivamente en relación con el grupo control. El grupo tratado con FTe+BCNU (n=10) no mostró diferencia con respecto al grupo control.

### **9.3. Efecto de la administración de FTe y/o Carmustina (BCNU) en el Glioma C6 murino en el porcentaje de apoptosis.**

En la figura 5 se representa la comparación del porcentaje de apoptosis entre el grupo tratado con FTe (n=10) y el grupo tratado con FTe+BCNU (n=10) mostrando una diferencia significativa de  $p<0.0002$  y  $p<0.0009$  respectivamente comparados con el grupo control.

En la tabla 5, se muestran los resultados obtenidos del conteo de células con reacción positiva a TUNEL de las 5 laminillas de cada grupo.

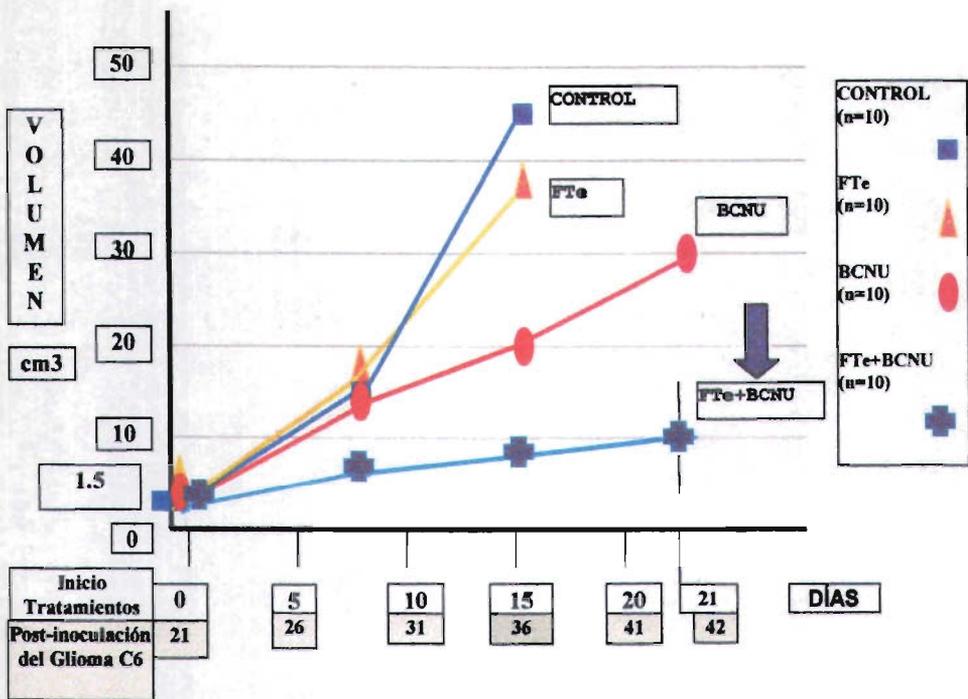
<b>Porcentaje de células con reacción positiva a TUNEL..</b>	<b>Control</b>	<b>BCNU</b>	<b>FTe</b>	<b>FTe+BCNU</b>
<b>Laminilla 1</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>40</b>	<b>29</b>
<b>Laminilla 2</b>	<b>6</b>	<b>1.5</b>	<b>31</b>	<b>19</b>
<b>Laminilla 3</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>29</b>	<b>29</b>
<b>Laminilla 4</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>47</b>	<b>33</b>
<b>Laminilla 5</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>36</b>	<b>20</b>

<b>Media</b>	<b>5</b>	<b>1.5</b>	<b>36.5</b>	<b>26</b>
<b>SD</b>	<b>1.22</b>	<b>0.5</b>	<b>7.23</b>	<b>6.16</b>

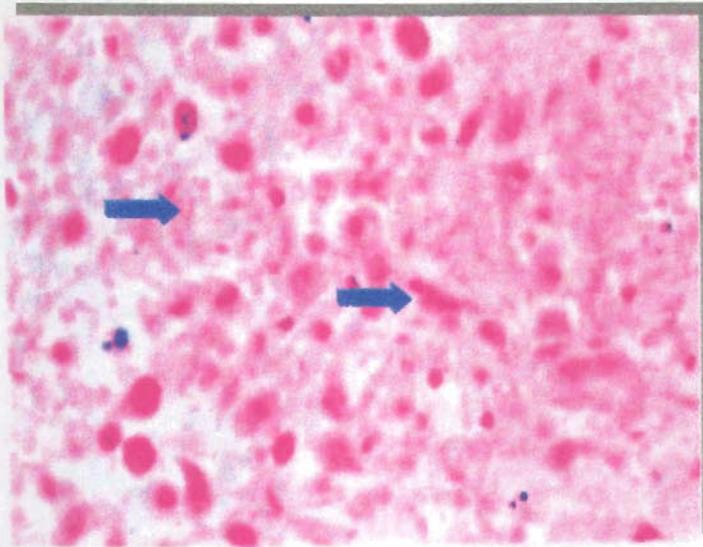
Tabla 5. Células con reacción positiva a TUNEL. Pretratadas con: Grupo control. 1 ml de Agua inyectable, i.T. Dosis única Carmustina (BCNU) 14mg/Kg, una dosis cada semana por tres semanas, Grupo tratado con \*Factor de Transferencia específico (FTe), 1ml. Dosis única; Grupo tratado con \*\*FTe+BCNU, 1ml FTe, i.T. Dosis única, 14mg/Kg, una dosis cada semana por tres semanas. \*p<0.0009, \*\*p<0.0002 comparados con el grupo control.

El grupo tratado con FTe fue el que mayor porcentaje de apoptosis generó.

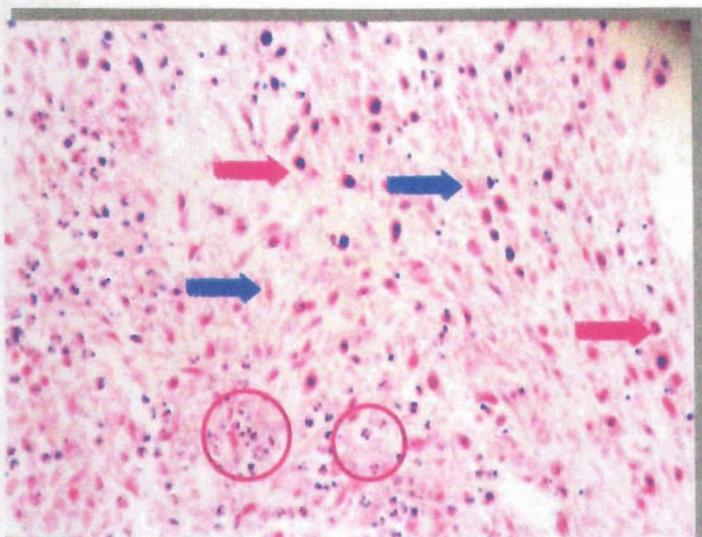
En las figuras 6 y 7 se aprecian las células con reacción positiva a la técnica de TUNEL.



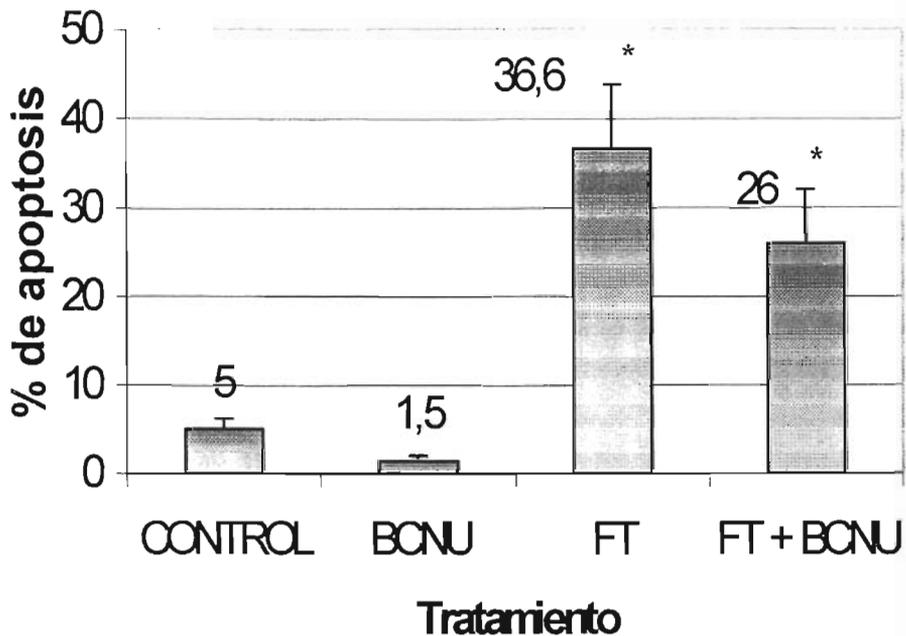
**Figura 2. Efecto de la administración de FTe y/o Carmustina (BCNU) en el Glioma C6 murino en el Volumen Tumoral.** La gráfica muestra cómo habiendo transcurrido 21 días post-inoculación del Glioma C6 y habiendo alcanzado el diámetro requerido (1.5cm<sup>3</sup>), se aplicaron los diferentes tratamientos y se observa la influencia que cada uno de éstos tuvo sobre el tumor. Se considera día cero al día en que se administraron los diferentes tratamientos. Se compara el crecimiento tumoral, destacando al grupo de la mezcla FTe+BCNU que aparece como el que menor tamaño desarrolló. El nivel de significancia determinó una diferencia estadística del grupo tratado con FTe+BCNU (n=10) p<0.005 con respecto al grupo control.



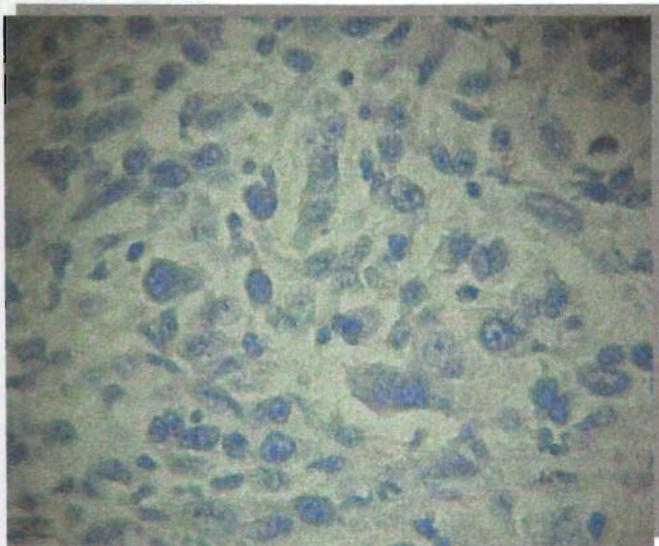
**Figura 3.** Necrosis coagulativa (flechas) en un corte histológico de glioma C6 murino por efecto de la administración de FTe. (Tinción H-E, 100x).



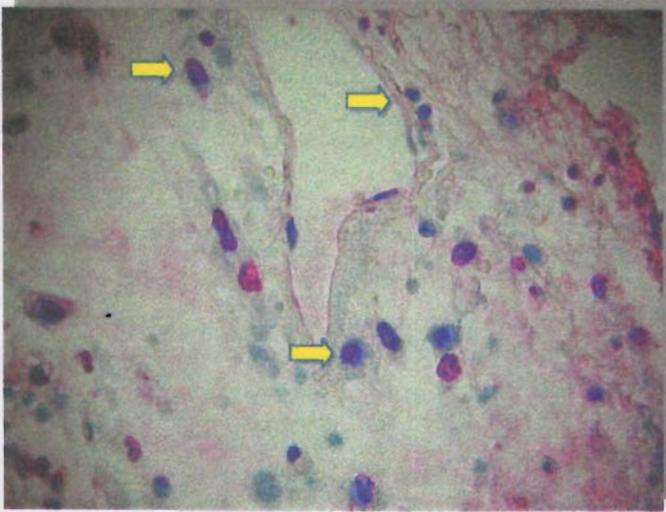
**Figura 4.** Células en Cariolisis (flechas en azul), células en Picnosis (flechas en rosa), infiltración de Neutrófilos (círculo en violeta). Corte histopatológico de glioma C6 murino tratado con BCNU. (Tinción H-E, 20x).



**FIGURA 5. Efecto de la administración de FTe y/o Carmustina (BCNU) en el Glioma C6 murino en el porcentaje de apoptosis. Comparación del porcentaje de apoptosis del grupo tratado con FTe (n=10) y el grupo tratado con la mezcla FTe+BCNU (n=10) mostrando una diferencia significativa de  $p < 0.0002$  y  $p < 0.0009$  respectivamente comparados con el grupo control. Factor de Transferencia específico (FTe); Carmustina o N-N bis (cloroetil)- N- nitrosourea (BCNU);**



**Figura 6.** Corte histopatológico de glioma C6 murino tratado con BCNU en el que no se observa reacción a la técnica de TUNEL. (Técnica de inmunohistoquímica TUNEL, 400x).



**Figura 7.** Corte histopatológico de glioma C6 murino tratado con FTe en el que se observa reacción positiva (flechas amarillas) a la técnica de TUNEL. (Técnica de inmunohistoquímica TUNEL, 400x).

## 10. DISCUSIÓN

### **EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE FTe Y/O CARMUSTINA (BCNU) EN EL GLIOMA C6 MURINO EN EL VOLUMEN TUMORAL**

En la figura 2 se observa que el grupo tratado con la mezcla FTe+Carmustina (BCNU) (n=10) es el que menor crecimiento desarrolló. Muestra una diferencia significativa de  $p < 0.005$  con respecto al grupo control.

La Carmustina (BCNU) es el fármaco quimioterápico más frecuentemente utilizado en el tratamiento de neoplasias en Sistema Nervioso Central (SNC). Actúa reduciendo el tamaño del tumor evitando la recombinación del ADN de las células neoplásicas impidiendo de esta manera su proliferación y provocando la muerte de las ya existentes. También se ven inhibidos el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) y Factor de Crecimiento Fibroblástico básico (bFGF) que son promovidos por las mismas células neoplásicas <sup>(4, 12, 40, 56)</sup>, de igual manera provoca hipoxia debido a la fibrosis que desarrolla el pulmón cuando este fármaco ha sido utilizado por periodos prolongados. La Carmustina (BCNU) evita de esta forma que la célula tumoral regule el proceso de angiogénesis y por lo tanto su crecimiento, expansión e invasión <sup>(14, 40, 56)</sup>.

Este fenómeno de disminución del volumen tumoral se logra también debido a la acción aniquiladora de los linfocitos cooperadores (CD4) y citotóxicos (CD8) que son promovidos por el FTe al ser administrado intratumoralmente. Estas células de defensa al atacar, inducen la muerte de las células tumorales vía necrosis o apoptosis <sup>(19, 55)</sup>.

Cabe mencionar que posterior a la administración de la mezcla de estos fármacos, se aprecia un ligero aumento en el volumen tumoral debido probablemente, a la infiltración de estos linfocitos y a la necrosis y/o apoptosis que generan al centro del tumor como lo que sucede por ejemplo en el cáncer nasofaríngeo, donde se ha observado que la administración del FTe semeja un pequeño crecimiento tumoral asociado con infiltración linfocitaria <sup>(19, 49, 58, 63)</sup> La presencia de infiltrado inflamatorio en

un tumor, se ha asociado con la involución de este y un mejor pronóstico <sup>(65)</sup>. Esto se ha demostrado en estudios experimentales diversos como en el realizado por el Dr. Sotelo y colaboradores <sup>(57)</sup>, donde se evaluó el efecto de la administración intratumoral de Quinacrina sobre el volumen tumoral de un glioma inducido experimentalmente. Concluye el estudio que la aplicación de este fármaco induce necrosis debido a la proliferación de células T intratumorales y a la acción citotóxica de la Quinacrina lo que provoca la involución del tumor tratado <sup>(57)</sup>.

Otros estudios permiten saber que la inhibición de la funcionalidad de la célula tumoral reduce el volumen de la neoplasia que conforma, permitiendo identificar cuáles son los factores o elementos del metabolismo celular tumoral que prolongan la vida de ésta y en consecuencia establecer la terapéutica más viable, por ejemplo, en el trabajo realizado por el Dr. Chinnaiyan <sup>(10)</sup> donde se muestra que el efecto combinado de FNT-alfa y la radiación ionizante reduce el volumen tumoral en el cáncer de mama debido a la muerte de las células neoplásicas por apoptosis que es iniciado por estos elementos terapéuticos <sup>(10)</sup>. Por su parte, también a cargo del Dr. Sotelo <sup>(3)</sup>, un estudio realizado en el 2001, demuestra que la administración de Ácido Acetilsalicílico (ASA) intratumoralmente en un glioma C6 murino inducido experimentalmente, reduce el volumen tumoral debido al efecto antiangiogénico del ASA <sup>(3)</sup>.

Lo anteriormente expuesto, demuestra que la aplicación de fármacos antineoplásicos vía intratumoral, induce la reducción del volumen tumoral debido a la muerte celular que éstos provocan y a la presencia de células de defensa que infiltran la neoplasia. Así pues, la administración en conjunto de FTe y Carmustina (BCNU) intratumoralmente en un glioma inducido experimentalmente, evita la formación de nuevas células tumorales porque la BCNU evita el crecimiento de éstas; el FTe potencializa la respuesta citotóxica evitando la expansión y permanencia de las mismas en el huésped, reduciendo en consecuencia el volumen tumoral <sup>(49, 52, 64)</sup>.

## EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE FTe Y/O CARMUSTINA (BCNU) EN EL GLIOMA C6 MURINO EN EL GRADO DE NECROSIS

De acuerdo a los resultados, el grupo tratado con FTe es el que mayor grado de necrosis presenta.

Si bien es cierto que el glioma presenta cierto grado de necrosis como parte de su patrón de desarrollo <sup>(6, 7, 26, 38)</sup>, también es cierto que la elevación súbita de este tipo de muerte celular pudiera ser provocado por la acción del FTe intratumoral, ya que el FTe induce la formación de linfocitos T cooperadores (CD4) y citotóxicos (CD8) funcionales con capacidad de ataque específico contra células tumorales <sup>(21, 49)</sup>. El término necrosis hace referencia a un espectro de cambios morfológicos que siguen a la muerte celular en el tejido vivo. Derivados en gran parte de la acción degradativa progresiva de las enzimas sobre la célula mortalmente lesionada <sup>(14, 62)</sup>. Además del antígeno y del MHC-II, se necesitan dos señales para inducir una respuesta óptima. Una señal proviene de las citocinas secretadas por las células presentadoras de antígenos; comprenden las Interleucinas 1 (IL-1) y 12 (IL-12). La otra señal es efecto de la unión entre las células T y las células presentadoras de antígenos y, por tanto, abarca las moléculas de adherencia de la superficie celular <sup>(14, 11, 23, 62)</sup>.

Las células T cooperadoras (CD4) son estimuladas tanto por IL-1 como por IL-12. La secreción de ambas por las células presentadoras de antígenos (macrófagos) es provocada por múltiples estímulos diferentes como es el caso de las células neoplásicas <sup>(11, 18, 19, 39, 62)</sup>. Su secreción también puede ser inducida cuando las células T entran en contacto por medio de la transmisión de señales por conducto del TCR. Una vez producida por los macrófagos, la IL-1 puede ser secretada en el líquido hístico o puede permanecer unida a la superficie del macrófago. La IL-1 que se une a la membrana, junto con un antígeno que se presenta de manera adecuada, pueden estimular la división de células T <sup>(11, 62)</sup>. Los efectos de los dos estímulos, el antígeno y la IL-1 que se encuentra unida a la membrana, son aditivos <sup>(11, 55)</sup>. Además de los

efectos del antígeno y la IL-1 o IL-12, una respuesta óptima de células T cooperadoras (CD4) requiere que haya una adhesión estrecha e interactiva entre la célula T y la célula presentadora de antígenos <sup>(11, 14, 62)</sup>.

Los macrófagos también secretan IL-12 que estimula la producción de células Th1 y éstas a su vez producen IFN- $\gamma$  que promueve la acción anticancerígena. La IL-1 secretada por los macrófagos activa linfocitos Th2 (subpoblación de linfocitos T cooperadores CD4) las cuales secretan TNF-  $\alpha$  que actúa sobre cerebro generando fiebre; estimula la quimiotaxis a macrófagos, aniquila células tumorales; produce necrosis en el centro de los tumores gracias a su efecto citotóxico. A su vez los linfocitos T citotóxicos (CD8), que también se dividen en células Th1 y que son estimulados por el IFN- $\gamma$  que secretan las células T cooperadoras CD4 Th1, secretan más IL-2 para activar una cantidad mayor de macrófagos y de esta manera se genera necrosis por el aniquilamiento de las células tumorales <sup>(11, 14, 15, 19, 62, 63)</sup>.

Se presupone que la aplicación del FTe intratumoralmente en un glioma inducido experimentalmente, promueve muerte celular por necrosis por activación de un complejo proceso en el cual intervienen las citocinas antes mencionadas, que son producidas por linfocitos T cooperadores (CD4), linfocitos T citotóxicos (CD8) y subpoblaciones de estas (Th1 y Th2) y por las células presentadoras de antígenos que se han generado por la capacidad inmunoestimulante del FTe <sup>(20, 21, 46, 49, 52)</sup>. En otros estudios como el realizado por el Doctor Ehtesham y colaboradores, se puede entender la importancia del papel que desempeñan las citocinas en el proceso de eliminación de células tumorales. Utilizaron como terapia contra el glioma la inoculación de IL-12 intratumoral que atrae cuerpos o tallos de células neuronales (NSCs: *Neural Stem Cells*) que son capaces de rastrear células de esta neoplasia que han generado metástasis a otra zona del SNC. Estas células generan una respuesta antitumoral de las células T de defensa que se asocia con el incremento de infiltración linfocitaria intratumoral y por lo tanto pudiera representar una modalidad terapéutica potente contra el glioma <sup>(18)</sup>.

El Doctor Ehtesham y su equipo, experimentaron también con FNT- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  inoculados intratumoralmente potencializando la infiltración de linfocitos T CD4 y CD8, y como ya se mencionó anteriormente, estas células de defensa promueven la muerte y eliminación de las células neoplásicas <sup>(19)</sup>.

De la misma manera la utilización terapéutica del FTe administrado vía intratumoral en el glioma, estimula la producción de linfocitos T CD4 y CD8 que a su vez sintetizarán citocinas que provocarán finalmente necrosis del tejido tumoral consiguiendo la eliminación de la neoplasia <sup>(46, 49)</sup>.

## EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE FTe Y/O CARMUSTINA (BCNU) EN EL GLIOMA C6 MURINO EN EL PORCENTAJE DE APOPTOSIS

En la figura 5 se representa gráficamente el porcentaje de apoptosis que presenta el grupo tratado con FTe (n=10). Muestra una significancia estadística de  $p < 0.0002$  con respecto al grupo control.

La apoptosis es una forma característica de muerte celular que se manifiesta por una condensación característica de la cromatina con fragmentación del DNA y cuya función es la eliminación de células ya sea en la organogénesis, función inmunitaria y en el crecimiento tisular, aunque también puede ser inducida por estímulos patológicos (11, 14, 15, 22, 24, 27, 43, 52).

El mecanismo de la apoptosis presenta varios estadios clave: en primer lugar, existen múltiples vías de aproximación a la muerte celular; en segundo lugar, existe una fase de control en la que el umbral apoptótico está establecido por la expresión y actividad relativas de diferentes factores reguladores positivos y negativos, (entre ellos la familia Bcl-2 de proteínas); en tercer lugar, existe una fase ejecutiva conservada, que implica la activación de las caspasas cuya función es la proteólisis terminal. (11, 14, 15, 22, 27).

Finalmente, los cuerpos apoptóticos son fagocitados por los macrófagos mediante fagocitosis mediada por receptores, sin generar inflamación. Si este proceso no es regulado puede contribuir a diversos estados patológicos. (14, 62) Los diversos procesos que pueden presentarse para inducir apoptosis, se explican a continuación. Los linfocitos T citotóxicos (CD8) reconocen los antígenos extraños presentes en la superficie de las células modificadas del huésped. Tras este reconocimiento, expresan el ligando Fas (Fas ligando FAS-L) en su superficie y destruyen las células efectoras mediante la unión a receptores Fas. Es decir: la apoptosis se produce por la unión del receptor Fas (CD95) de la célula tumoral y el ligando Fas (CD95L) de los linfocitos T

citotóxicos (CD8) (Ligador Fas-Fas) <sup>(14, 61, 62)</sup>.

De manera alternativa, los linfocitos T citotóxicos (CD8) inducen la apoptosis de las células tumorales mediante la secreción de Perforina, una molécula transmembrana con capacidad para formar poros, y a través de la liberación por exocitosis de gránulos citoplásmicos en las células tumorales. La proteasa de la serina Granzima B representa el componente citotóxico crítico en este proceso. Granzima B tiene la capacidad de fragmentar proteínas en los residuos aspartato y también puede activar diversas caspasas celulares <sup>(10, 11, 14, 61, 62)</sup>.

La apoptosis puede ser promovida por la activación de uno de los receptores TNF (TNFR1) por la citocina TNF que puede dar lugar a apoptosis al inducir la asociación del receptor con la proteína adaptadora TRADD (TNFR: proteína adaptadora con una región de muerte celular). Tal y como ocurre en el sistema de Ligador Fas-Fas, la proteína TRADD se une a su vez a FADD y causa apoptosis a través de la activación de la caspasa <sup>(27, 54, 62)</sup>.

La exposición de las células a radiación o a agentes quimioterápicos, induce apoptosis a través de un mecanismo que se inicia con la lesión del DNA (estrés genotóxico) y que implica al gen de supresión tumoral p53. Este gen, el p53, se acumula cuando el DNA está lesionado y detiene el ciclo celular (en la fase G1) para que se pueda producir la reparación. Sin embargo, si el proceso de reparación fracasa, el p53 desencadena la apoptosis <sup>(27, 54, 62)</sup>. Por tanto, el gen p53 estimula normalmente la apoptosis, pero cuando sufre mutación o está ausente (como ocurre en ciertos cánceres), favorece la supervivencia celular. Por ello, el gen p53 parece actuar como un factor crítico de "vida o muerte" en el caso de estrés genotóxico. El mecanismo por el que la lesión del ADN estimula el dispositivo efector distal de muerte, las caspasas, es complejo, pero parece implicar su bien caracterizada función en la regulación transcripcional <sup>(27, 54, 62)</sup>.

Se presupone, que el FTe administrado intratumoralmente en un glioma inducido experimentalmente, promueve muerte celular por apoptosis por activación de las caspasas, ya que como se mencionó anteriormente, el FTe es un inmunomodulador que estimula la formación de linfocitos T cooperadores (CD4) y citotóxicos (CD8) y estos últimos tienen la capacidad de perforar la membrana celular y de fragmentar el ADN gracias a la Granzima B que secretan y así, provocar la apoptosis debido a la activación de las caspasas, en específico caspasa 3 <sup>(10, 11, 14, 15, 22, 24, 27, 43, 52, 62)</sup>. aunque no podríamos descartar cualquiera de las otras vías de activación de apoptosis ya que no sólo participa una clase de célula de defensa en el proceso de citorreducción y muerte tumoral.

Tal como lo explica el Dr Choi en su experimento <sup>(11)</sup>, donde da cuenta de la interacción de todos estos receptores y sus ligandos, de citocinas e interleucinas y la influencia que tienen todos estos factores en la expresión de la apoptosis al activar de diversas formas la muerte de una célula neoplásica, ya sea vía caspasa 3 o caspasa 8 e incluso caspasas no determinadas <sup>(11)</sup>.

## 11. CONCLUSIONES

a). El FTe aplicado intratumoralmente, aumenta el porcentaje de apoptosis en el Glioma C6.

c). El FTe aplicado intratumoralmente reduce el crecimiento del Glioma C6.

## 12. REFERENCIAS

1. Aiello SE and Mays A. El Manual Merck de Veterinaria. 5ª Edición. OCEANO/CENTRUM. Barcelona, España. 2000.
2. Ansari B; Coates BD; Greenstein BD. and Hall P. A. in situ end labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. J. Pathol 1993; 170: 1- 8.
3. Arrieta O; Guevara P; Reyes S; Palencia G; Rivera E. and Sotelo J. Paradoxical effect of aspirin on the growth of C6 rat glioma and on time of development of ENU-induced tumors of the nervous system. J Cancer Res Clin Oncol. 2001; 127:681-686.
4. Arrieta O; Guevara P; Reyes S; Ortiz A; Rembao D and Sotelo J. Protamine Inhibits Angiogenesis and Growth of C6 Rat Glioma; a Synergistic Effect when Combined with Carmustine. European Journal of Cancer, 1998; 34 (13): 2101- 2106.
5. Berkow R and Fletcher JA. El Manual Merck de Diagnóstico y Terapéutica. 9ª Edición Española. OCEANO/CENTRUM. Barcelona, España. 1992.
6. Bibbo M. Comprehensive Cytopatology. 2th Edition. W. B. Saunders Co. 1997.
7. Black PM. Brain tumors (two parts). N Engl J Med.1991; 324 (21-22):147, 1555.
8. Calabresi P. Leukemia after cytotoxic chemotherapy a pyrrhic victory? N Engl J Med 1983; 309:1118-9.

9. Carter SK; Newman JW. Nitrosoureas: (1,3 bis) (2-cloroethyl)-1-nitrosourea and 1-(1-cloroethyl)-3-ciclohexyl-1-nitrosourea clinical crochure. *Cancer Chemother Rep* 1968; 1:1115-51.
10. Chamberlain MC; Kormanik PA. Practical guidelines for treatment of malignant gliomas. *West J Med* 1998; 168(2):114-120.
11. Chinnaiyan Arul M; Prasad U; Shankar S; Hamstra DA; Shanaiah M; Chenevert TL; Ross BD. and Rehemtulla A. Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000. February 15; 97(4):1754-1759.
12. Choi Ch; Kutsch O; Park J; Zhou T; Seol Dai-Wu and Benveniste EN. Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand Induces Caspase-Dependent Interleukin-8 Expression and Apoptosis in Human Astroglioma Cells. *Molecular and Cellular Biology*, February. 2002; 22(3); 724-736.
13. Corrado F; Pizza G; De Vinci C and Corrado G. Immunotherapy with transfer factor hormone- resistant metastasized carcinoma of the prostate. *Arch. Esp. Urol*. 42; suppl. 1989; 2:191-6.
14. Cotran RS; Kumar V and Collins T. Robbins. *Patología Estructural y Funcional*. Sexta Edición. McGraw- Hill Interamericana. México. 2000.
15. Cuello- Carrión FD and Ciocca DR. Improved Detection of Apoptotic Cells Using a Modified in situ TUNEL Technique. *J. Histochemistry* 47 1999; (5): 837- 839.
16. Crusinberry R. and Williams RD. Immunotherapy of renal cell cancer. *Semin. Surg. Oncol* 7 1991;(4):221-4

17. Daumas- Duport C; Scheithaver O'Fallon J; Kelly P. Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer* 1988;62:2152- 2165.
18. Ehtesham M; Kabos P; Kabosova A; Newman T; Black KL; Yu JS. The use of interleukin 12-secreting neural stem cells for the treatment of intracranial glioma. *Cancer Res.* 2002. Oct. 15; 62(20):5657-63.
19. Ehtesham M; Samoto K; Kabos P; Acosta FL; Gutierrez MA; Black KL; Yu JS. *Cancer Gene Ther.* 2002. Nov; 9(11):925-34.
20. Estrada- Parra S; Castrejón OV; Rebora F; Díaz ML; Padierna J. Inmunoterapia de la tuberculosis pulmonar avanzada con Factor de Transferencia Específico. *Salud Pública, Méx.* 1993;25:589-600.
21. Estrada PS; Cabezas OQ; Velazco C; Ondarza AR; Chávez SR; Berron PR. El sistema inmune y el uso del factor de transferencia. *Ciencia UANLII* 1999; (3): 237-243.
22. Gavrieli Y; Sherman Y; Ben- Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol* 1992; 119: 493-501.
23. Girolami U; Anthony DC and Frosch MP. The central nervous system. In Robbins. *Pathologic basis of diseases. Cotran, Kumar and Collins.* 6<sup>th</sup> edition. WB Saunders. USA. 1999;1343- 1346.
24. Gorczyca W; Tuziak T; Kram A; Malamed MR; Darzynkiewicz Z. Detection of apoptosis- associated DNA strand breaks in fine- needle aspiration biopsies by in situ end labelling of fragmented DNA. *Cytometry*; 1994;15: 169- 175.

25. Gottlieb AA; Sizemore RC; Gottlieb MS and Kern CH. Rationale and clinical results of using leucocyte-derived immunosuppressive therapies in HIV disease. *Biotherapy* 1995;9:27:31.
26. Guevara P and Sotelo J. C6 rat glioma grown into the peritoneal cavity, a large source of tumoral cells for subcutaneous transplant of glioma. *Journal of Neuro-Oncology*. 1999; 44:91-92.
27. Hickman MJ and Samson LD. Role of DNA mismatch repair and p53 in signaling induction of apoptosis by alkylating agents. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; September 14; 96 (19): 10764-10769.
28. Kerrigan D; Pommier Y; Kohn KW. Protein-linked DNA strand breaks produced by etoposide and teniposide in mouse L1210 and human VA-13 and HT-29 cell lines: Relationship to cytotoxicity. *NCI Monogr*. 1987;4: 117- 121.
29. Kimatura I; Kochi M; Matsumoto Y; Veoda; Kuratsu J; Ushio Y. Intrathecal chemotherapy with 1,3 bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea encapsulated into hybrid liposomes for meningeal gliomatosis: an experimental study. *Cancer Res* Sep 1996; 1:56(17):3986-92.
30. Kirkpatrick CH. Transfer Factors: Identification of Conserved Sequences in Transfer Factor Molecules. *molecular Medicine*. 2000, 6 (4): 332-341.
31. Kirkpatrick CH; Rozzo SJ and Mascali. Murine transfer factor II. Transfer of delayed hypersensitivity to synthetic antigens. *J. Immunol*. 1985;134:1723-1727.
32. Kirkpatrick CH; Rozzo SJ; Mascali. Murine Transfer Factor III. Specific interactions between transfer factor antigen. *J Immunol*. 1985;135:4027-4033.

33. Kirkpatrick CH. Transfer factor. *J. Aller Clin. Immunol.* 1988;81:803-813.
34. Kirkpatrick C.H. Structural nature and functions of transfer factors. *Ann NY Acad Sci.* 1993;685:362.
35. Lawrence HS and Ascher MS. *In vitro* properties of leukocyte dialysates containing transfer factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1974; 74:1178-1182.
36. Lawrence HS. Selective Immunotherapy with Transfer Factor. En: *Clinical Immunobiology* Academic Press. New York, USA. 1974;116-120.
37. Lawrence HS and W Borkowsky. A new basis for the Immunoregulatory activities of Transfer Factor an arcane dialect in the Language of cells. *Cell. Immunol.* 1983; 32:102-116
38. López- González MA and Sotelo J. Brain tumors in México: Characteristics and prognosis of Glioblastoma. *Surg Neurol.* 2000;53: 157- 162.
39. Lysiak JJ. The role of tumor necrosis factor- alpha and interleukin-1 in the mammalian testis and their involvement in testicular torsion and autoimmune orchitis. *Reprod Biol Endocrinol.* 2004. Mar. 10;2(1):9.
40. Mallat Z and Tedgui A. Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance. *British Journal of Pharmacology.* 2000, July. 130 (5): 947-1190.
41. Merlo A; Mueller-Brand J; Maecke HR. Comparing monoclonal antibodies and small peptidic hormones for focal targeting og malignant gliomas. *Acta Neurochir Suppl.* 2003;88:83-91.

42. Michailowsky C; Niura FK; do Valle AC; Sonohara S; Meneguín TD; Tsanaclis AM. Experimental tumors of the central nervous system: standardisation of a model in rats using the 9L glioma cells. *Arq Neuropsiquiatr.* 2003, Jun;61(2<sup>a</sup>):234-40.
43. Migheli A; Cavalla P; Marino S; Schiffer D. A study of apoptosis in normal and pathologic nervous tissue after in situ end labelling of DNA strand breaks. *J Neuropathol Exper Neurol*, 1994;53: 606- 616.
44. Moertel CG. Current concepts in chemotherapy of gastrointestinal cancer. *N Engl J Med*1978; 299:9.
45. Muhyi AS. Clinical use of nitrosoureas in patients with malignant melanoma: a review. En Prestakyo, A.W; Baker, L.H; Crooke, S.T; Carter, S.K; Schein, P, editores. Nitrosoureas, current status a new development. Academic Press, New York, 1981;301-23.
46. Pedraza M. Berenice. Empleo de Factor de Transferencia (FT) de origen porcino como agente inmunoterápico en Glioma. Tesis. ENCB-IPN. México. 2001.
47. Petersen EA; Greenberg LE; Manzara T and Kirkpatrick CH. Murine Transfer Factor I. Description of the model and evidence for especificity. *J. Immunol.* 1981;126:2480-2484.
48. Pilotti V; Mastroiilli M; Pizza G; De Vinci C; Bussuti L; Palareti A; Gozztti G and Cavallari A. Transfer factor and adyuvant to non-small cel lung cancer therapy. *Biotherapy* 1996;9 (1-3):117-121.
49. Pineda OP. B. Efecto del Factor de Transferencia (FT) de origen porcino como agente inmunoterápico en glioma C6 de rata. Tesis de Maestría. IPN. 2003.

50. Pizza G; DeVinci C; Fudenberg HH. Transfer factor in malignancy progress in drug Research. 1993; 42:401-420.
51. Prasad U. Transfer factor with anti-EBV activity as an adjuvant therapy for nasopharyngeal carcinoma: a pilot study. *Biotherapy* 1996;9(1-3):109-15.
52. Rangel RIC. Evaluación morfológica del efecto del Factor de Transferencia Específico en el glioma C6 murino. Tesis de Maestría. FES-C. UNAM. 2004.
53. Roseblum MK; Bilbao JM and Ang LC. Neuromuscular system. In Ackerman's *Surgical Pathology*. edited by Rosai J. 8<sup>th</sup> edition. Mosby. USA. 1996;2268- 2277.
54. Ross BD; Zhao Yong-Jie; Neal ER; Stegman LD; Ercolani M; Ben-Yoseph O and Chenevert TL. Contributions of cell kill and posttreatment tumor growth rates to the repopulation of intracerebral 9L tumors after chemotherapy an MRI study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1998. June 9; 95 (12):7012-7017.
55. Rozzo SJ; Kirkpatrick CH. Purification of Transfer Factor. *Mol Immunol* Feb 1992;29(2):167-82.
56. Rozzo SJ; Merryman CF and Kirkpatrick CH. Murine Transfer Factor. IV. Studies with Genetically Regulated Immune Responses. *Cellular Immunology* March 1988, 115,130-145.
57. Sampson JH; Crotty LE; Lee S; Archer GE; Ashley DM; Wikstrand CJ; Hale LP; Small C; Dranoff G; Friedman AH; Friedman HS and Bigner DD. Unarmed, tumor-specific monoclonal antibody effectively treats brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000. June. 20: 97 (13): 7503-7508.

58. Sato TN. Emerging concept in angiogenesis: specification of arterial and venous endothelial cells. *British Journal of Pharmacology*. 2003; October. 140 (4): 585-780.
59. Sotelo J; Guevara P; Reyes S and Arrieta O. Interstitial quinacrine for elimination of abnormal tissue; therapy of experimental glioma. Neuroimmunology Unit, National Institute Of Neurology and Neurosurgery and the Instituto De Investigaciones Biomédicas, UNAM. 2000, 128: 439-46.
60. Strik HM; Stoll M; Meyermann R. Immune cell infiltration of intrinsic and metastatic intracranial tumours. *Anticancer Res*. 2004, Jan-Feb;24(1):37-42.
61. Tada M and Tribolet N. Recent advances in immunobiology of brain tumors. *Journal of Neuro-oncology*. 1993; 17: 261-271.
62. Tamayko M and Reynolds P. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemoter Pharmacol*. 1989; 24:148-154.
63. Timoshanko JR; Kitching AR; Iwakura Y; Holdsworth SR; Tipping PG. Leukocyte-derived interleukin-1beta interacts with renal interleukin-1 receptor I to promote renal tumor necrosis factor and glomerular injury in murine crescentic glomerulonephritis. *Am J Pathol*. 2004, Jun;164(6):1967-77.
64. Tizard R Ian. *Inmunología Veterinaria*. Quinta Edición. McGraw- Hill Interamericana. México. 1998.
65. Von Hanwehr RI; Hofman FM; Taylor CR; Apuzzo M.L. Mononuclear lymphoid populations infiltrating the microenvironment of primary CNS tumors. *J. Neurosurg*. 1984; 60: 1138-1147.

66. Tumores Cerebrales. Reporte Massachussets General Hospital and Children Hospital, Boston, EUA. [www.well-conected.com](http://www.well-conected.com) 2001.
67. Yoshida D; Ikeda Y and Nakazawa. Quantitative analysis of copper, zinc and copper/zinc ratio in selected human brain tumors. Journal of Neuro-oncology. 1993; 16:109-115.