



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EFFECTO DEL FACTOR DE TRANSFERENCIA EN EL DESARROLLO DE  
GLIOBLASTOMAS HUMANOS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**VALERIA RUBÍ MIRELES LOZANO**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX**

**2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **IGNACIO CAMACHO ARROYO**  
VOCAL: **CAROLINA GUZMAN ARRIAGA**  
SECRETARIO: **ALIESHA ARACELI GONZALEZ ARENAS**  
1er. SUPLENTE: **EDITH ARACELI CABRERA MUÑOZ**  
2do. SUPLENTE: **MIGUEL ANGEL PEÑA ORTIZ**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio C138, Edificio C del Instituto de Investigación Biomédicas, UNAM. Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental.

---

**Asesor del tema: Dra. Aliesha  
Araceli González Arenas**

---

**Sustentante: Valeria Rubí Mireles  
Lozano**

## ÍNDICE

<b>1. ABREVIATURAS .....</b>	<b>5</b>
<b>2. RESUMEN.....</b>	<b>7</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>4. ANTECEDENTES.....</b>	<b>9</b>
4.1 Tumores primarios del sistema nervioso central.....	9
4.1.1 Astrocitomas.....	9
4.3 Tratamiento para glioblastoma.....	12
4.3.1 Tratamiento Clásico .....	12
4.3.2 Tratamiento actual.....	14
4.3.3 Inmunoterapia .....	16
4.4 Factor de Transferencia .....	16
4.4.1 Definición .....	16
4.4.2 Obtención.....	17
4.4.3 Estructura química y componentes.....	18
4.4.4 Actividad inmunológica .....	19
4.4.5 Aplicaciones.....	22
<b>5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>24</b>
<b>6. HIPÓTESIS.....</b>	<b>24</b>
<b>7. OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
7.1 Objetivo General.....	25
7.2 Objetivos Particulares.....	25
<b>8. METODOLOGÍA.....</b>	<b>26</b>
8.1 Cultivo celular.....	26
8.2 Ensayo <i>in vitro</i> .....	26
8.2.1 Efecto de FT en la viabilidad celular.....	26
8.3 Ensayo <i>in vivo</i> .....	27
8.3.1 Implante de células tumorales en la corteza motora de rata.....	27
8.3.2 Tratamientos.....	27
8.3.3 Inmunofluorescencia .....	28
8.4 Análisis estadístico.....	30
<b>9. RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>

9.1 Evaluación del FT en la viabilidad de la línea celular U87 .....	31
9.3 Influencia del FT en la migración de las células U87 implantadas en la corteza motora de rata. ....	32
9.4 Influencia del FT en el tamaño del tumor formado a partir de células U87 implantadas en la corteza motora de rata. ....	35
<b>10. DISCUSIÓN.....</b>	<b>38</b>
<b>11. CONCLUSIONES.....</b>	<b>42</b>
<b>12. REFERENCIAS .....</b>	<b>43</b>

## 1. ABREVIATURAS

AIC	5-aminoimidazol-4-carboxamida
ANOVA	Análisis de varianza
CD2	Cúmulo de diferenciación 2
CD4	Cúmulo de diferenciación 4
CD8	Cúmulo de diferenciación 8
DLE	Extracto dializable de Leucocitos ( <i>dialyzable leukocyte extract</i> )
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTH	Hipersensibilidad cutánea tardía ( <i>delayed type hypersensitivity</i> )
EEP	Error estándar del promedio
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ENCB/IPN	Escuela Nacional de Ciencias Biológicas/Instituto Politécnico Nacional
FDA	Food and Drug Administration
FT	Factor de Transferencia
GFP	Proteína verde fluorescente ( <i>Green Fluorescent Protein</i> )
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
IDH1	Isocitrato deshidrogenasa ( <i>isocitrate dehydrogenase</i> )
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IL-10	Interleucina 10
IL-12 $\beta$	Interleucina 12 subunidad beta
IL-13	Interleucina 13
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
kDa	Kilodalton
Ki-67	Marcador de proliferación celular
MGMT	O6-metilguanina- DNA metiltransferasa
mRNA	Mensajero de ácido ribonucleico
MTIC	5-(3-metiltriazin-1-il)imidazol-4-carboxamida
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil) 2H tetrazolio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NK	Natural Killer
OMS	Organización Mundial de la Salud
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaqueta
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
RB1	Retinoblastoma
SEC	Cromatografía por exclusión de tamaño ( <i>size exclusion chromatography</i> )

SFB	Suero fetal bovino
SNC	Sistema Nervioso Central
TAM	Macrófagos y microglia asociados a tumor
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
TLR2	Receptor tipo Toll 2
TLR4	Receptor tipo Toll 4
TMZ	Temozolomida
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TP53	Proteína supresora de tumores 53
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
VEGFR	Receptor de factor de crecimiento vascular endotelial

## 2. RESUMEN

El Factor de Transferencia (FT) es un medicamento de origen biológico que está indicado para diferentes padecimientos, entre los que se incluyen algunas neoplasias como cáncer de pulmón, cáncer de estómago, melanoma y cáncer de mama, entre otros. En el presente estudio se evaluó el efecto de este medicamento en el desarrollo de glioblastoma multiforme, el cual es el tumor cerebral más agresivo.

Para estudiar el efecto del FT sobre la viabilidad celular en un modelo *in vitro*, se utilizó la línea celular U87 derivada de un glioblastoma humano. Para este fin se utilizó el método de biorreducción de una sal de tetrazolio (MTS) después del tratamiento con FT en el que se probaron diferentes concentraciones (1, 10, 100 pg/mL, 1, 10, 100 ng/mL y 1 µg/mL). Adicionalmente se realizó un modelo *in vivo*, el cual consistió en implantar en la corteza motora de la rata, células U87 que contienen el transgen de la proteína verde fluorescente (GFP). Estos animales fueron tratados con FT, 10 días en un periodo de 23 días por vía oral, para posteriormente diseccionar sus cerebros, realizar cortes histológicos y mediante inmunofluorescencia se detectaron a la GFP y al marcador de proliferación Ki-67 en los cortes generados.

En este trabajo, se observó un marcado aumento en la viabilidad celular a las 96 horas de incubación con todas las concentraciones del FT utilizadas. En el modelo *in vivo*, no se observó un efecto del FT sobre la distancia de migración de las células U87-GFP, pero sí un aumento significativo en el tamaño del tumor.

### 3. INTRODUCCIÓN

Los astrocitomas son neoplasias que se pueden originar a partir de un tipo de células gliales llamadas astrocitos, progenitores gliales o células troncales cancerosas (Chesler, 2012). La Organización Mundial de la Salud (OMS) los ha clasificado de acuerdo a sus características histopatológicas en: astrocitoma pilocítico (grado I), astrocitoma difuso (grado II), astrocitoma anaplásico (grado III) y glioblastoma multiforme (grado IV) (Louis et al., 2007). Los astrocitomas de grados III y IV son los más frecuentes y de mayor malignidad en la población mundial. El pronóstico depende de múltiples factores como son el grado de malignidad, la localización, el tamaño y el tiempo de evolución, sin embargo, presentan una baja tasa de recuperación, por lo que el tiempo de supervivencia en general es muy corto. Se ha reportado entre 24 a 36 meses para grado III y de 9 a 15 meses para astrocitomas grado IV (Ray, 2010). Los tratamientos como la neurocirugía y la radioterapia no dan resultado en una alta proporción de pacientes e incluso la quimioterapia es poco exitosa logrando solamente un modesto aumento de la supervivencia (Osoba, 2000). Las terapias hasta ahora utilizadas para tratar a los astrocitomas resultan invasivas y poco efectivas, por lo que el uso de nuevas estrategias para disminuir el desarrollo de estos tumores resulta de alta relevancia para mejorar la supervivencia de los pacientes.

A pesar de su ubicación dentro del Sistema Nervioso Central (SNC), los tumores cerebrales pudieran ser efectivamente tratados mediante la activación del sistema inmune (Ray, 2010). El FT es un extracto dializable de leucocitos (DLE) el cual estimula la respuesta inmunológica de personas con padecimientos causados por desajustes del sistema inmunitario y está indicado para tratar enfermedades alérgicas, autoinmunes, infecciosas e inmunodeficientes y como apoyo al tratamiento de cáncer de mama, cáncer de riñón y melanoma, por mencionar algunos (Medina-Rivero, 2014). El efecto del FT sobre el desarrollo de glioblastomas ha sido poco estudiado. Existe un solo trabajo en el que se evaluó el efecto de DLEs porcinos en ratas con glioma C6, en el cual se observó una reducción en el tamaño del tumor, aumento el número de células CD2<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y NK y un aumento el porcentaje de células tumorales apoptóticas. Es por lo

anterior que en este trabajo se decidió evaluar el efecto de FT en la línea celular U87 derivada de un glioblastoma humano, tanto en un modelo *in vitro* como *in vivo*.

## **4. ANTECEDENTES**

### **4.1 Tumores primarios del sistema nervioso central**

Los tumores cerebrales primarios son una de las enfermedades más devastadoras que enfrenta la medicina moderna. Ellos representan el 85% de los tumores del sistema nervioso central y son clasificados de acuerdo a sus características histopatológicas. El otro 15% lo constituyen tumores de la médula espinal, con una distribución histológica diferente (González et al., 2007). La incidencia de tumores cerebrales primarios malignos es de aproximadamente 3.7 por cada 100,000 hombres y 2.6 por cada 100,000 mujeres. La tasa parece ser más alta en países más desarrollados (5.8 por cada 100,000 hombres y 4.1 por cada 100,000 mujeres) que en países menos desarrollados (3.0 por cada 100,000 hombres y 2.1 por cada 100,000 mujeres) (Bondy, 2008). La frecuencia de aparición de tumores cerebrales es mayor en hombres, a excepción del meningioma, el cual es más frecuente en mujeres (González et al., 2007).

#### **4.1.1 Astrocitomas**

Los tumores que surgen a partir del neuroepitelio abarcan un subgrupo de neoplasias referidas colectivamente como "gliomas". Los gliomas representan aproximadamente el 70% de los tumores cerebrales primarios (Ohgaki, 2005). De este grupo, los de mayor frecuencia en la práctica clínica son astrocitomas, oligodendrogliomas, y ependimomas. Los astrocitomas se subdividen a su vez por un sistema de clasificación de cuatro niveles, elaborado por la OMS, que se basa en sus características histopatológicas, siendo el grado I el de menor malignidad y el grado IV el más agresivo y maligno (Louis et al., 2007).

#### **4.1.1.1 Astrocitoma pilocítico (Grado I)**

Estos tumores se caracterizan por ser tumores bien delimitados, de aspecto sólido, crecimiento lento, que se presentan típicamente en niños y adultos jóvenes. Se localiza alrededor del tercer y cuarto ventrículos, en el nervio óptico, hipotálamo, tálamo, cerebelo y tallo cerebral (Packer, 2016 y Greenberg, 1999). Histopatológicamente se caracteriza por baja o moderada celularidad y arquitectura bifásica, constituido por áreas compactas con células tumorales bipolares y áreas microcíticas con células tumorales multipolares. Una característica importante para el diagnóstico, aunque no única para estos tumores, es la presencia de fibras de Rosenthal y cuerpos granulares eosinófilos (Tonn, 2010). La terapia de primera elección es la cirugía, la cual puede ser curativa si se consigue la resección completa del tumor. La radioterapia adyuvante después de la cirugía puede ser necesaria en pacientes con más edad, disecciones incompletas o con otros factores de riesgo. Cuando se logra disecar completamente el tumor, el pronóstico del paciente mejora favorablemente con una sobrevida mayor a 20 años en más del 85% de los casos (Tihan, 2010).

#### **4.1.1.2 Astrocitoma difuso (Grado II)**

Son tumores de crecimiento lento, bien diferenciados, estos logran evolucionar a tumores de mayor malignidad. Generalmente afecta a adultos jóvenes con un pico de incidencia entre los 30 y 40 años. Histológicamente está compuesto por astrocitos fibrilares bien diferenciados, baja o moderada celularidad y crecimiento infiltrativo dentro del parénquima cerebral adyacente. Se localizan con mayor frecuencia en los hemisferios cerebrales, pero también pueden desarrollarse en el tallo cerebral y médula ósea. Son capaces de infiltrar estructuras contralaterales vía el cuerpo calloso (Tonn, 2010), debido a esta característica la resección del tumor es más complicada. Dependiendo del paciente, el tratamiento de elección es la resección quirúrgica seguida de quimioterapia y/o radioterapia (Arko et al., 2010). En general, la media de sobrevida de los pacientes es de 5 años (Louis et al., 2007).

#### **4.1.1.3 Astrocitoma anaplásico (Grado III)**

Se localizan preferentemente en los hemisferios cerebrales y usualmente afectan a adultos entre 45 y 69 años de edad. Pueden desarrollar de novo o de un astrocitoma difuso (grado II) preexistente. Tienden a evolucionar a glioblastoma con una media de vida de dos años. Se caracteriza histológicamente por atipia nuclear, hiper celularidad, prominente actividad mitótica y lesiones difusamente infiltrantes. Se presenta en pacientes más jóvenes que el glioblastoma y tiene mejor pronóstico (Tonn, 2010 y Vecht, 2007). El tratamiento estándar incluye la máxima remoción posible del tumor sin causar deficiencias neurológicas, radioterapia y/o quimioterapia (Buckner et al., 2007). La media de supervivencia es de 2 a 3 años y generalmente está determinado por el tiempo requerido para la progresión a un tumor de grado IV (Arco et al., 2010).

#### **4.1.1.4 Glioblastoma multiforme (Grado IV)**

Los glioblastomas surgen más frecuentemente en la materia subcortical en los hemisferios cerebrales. Los sitios más frecuentemente afectados son los lóbulos temporal (31%), parietal (24%), frontal (23%) y occipital (16%). La infiltración del tumor se extiende frecuentemente dentro de la corteza adyacente y mediante el cuerpo calloso al hemisferio contralateral (Louis et al., 2007). En niños se encuentran particularmente localizados en el tallo cerebral y su incidencia suele ser poco frecuente (Tonn, 2010).

En adultos es el tumor cerebral más frecuente y la neoplasia más maligna con predominante diferenciación astrocítica; las características histopatológicas incluyen atipia nuclear, pleomorfismo celular, actividad mitótica, trombosis vascular, proliferación y necrosis. Se manifiestan rápidamente de novo, sin lesiones precursoras aparentes (glioblastoma primario). El glioblastoma secundario puede desarrollar a partir de un astrocitoma difuso o de un astrocitoma anaplásico. Debido a naturaleza infiltrante, los glioblastomas no pueden ser completamente disecados. La supervivencia de los pacientes es generalmente menor a un año (Louis et al., 2007).

El glioblastoma es el tumor primario más frecuente, comprende aproximadamente el 12% de los tumores intracraneales y aproximadamente 60-75% de los tumores astrocíticos (Lantos et al., 2002). La edad pico en la que se presentan los glioblastomas es de 45-70 años (Louis et al, 2007).

#### **4.1.1.4.1 Alteraciones moleculares de los glioblastomas**

Existen una suma de alteraciones genéticas y aberraciones cromosómicas que son las responsables de la iniciación y progresión de los gliomas, explicando así la heterogeneidad genética que exhiben. Por ejemplo, se aprecian mutaciones en genes implicados en la regulación celular [receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN)], en la desregulación del metabolismo energético [producción de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) mediante la isocitrato deshidrogenasa (IDH1)], en el ciclo celular [retinoblastoma (RB1)], apoptosis [proteína supresora de tumores 53 (TP53)], regulación de la metilación [O6-metilguanina- DNA metiltransferasa (MGMT)], crecimiento, división celular y angiogénesis [factor de crecimiento derivado de plaqueta (PDGF)], por mencionar algunos. También se observa pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 10q, el cual se asocia con una sobrevida corta. El estado de metilación alta del promotor de la enzima MGMT se asocia con un pronóstico favorable en los pacientes que reciben quimioterapia con temozolomida (TMZ) y radioterapia (Melo, 2014 y Tonn, 2010).

### **4.3 Tratamiento para glioblastoma**

#### **4.3.1 Tratamiento Clásico**

##### **4.3.1.1 Cirugía**

La cirugía es el tratamiento inicial para los gliomas e incluye biopsia de tejido para el diagnóstico y la resección subtotal o macroscópica. Los beneficios de la resección quirúrgica incluyen la disminución de la carga tumoral, efecto de masa y la necesidad de esteroides. Además, se puede proporcionar un diagnóstico de tejido más preciso que la biopsia y puede mejorar los déficits

neurológicos. Desafortunadamente, debido a su naturaleza difusa infiltrante, la resección completa de los gliomas no es posible. Algunos informes han reportado un aumento en la supervivencia libre de progresión asociado a una resección total, sin embargo, debido a que estos estudios se basaron en una población pequeña, ninguna recomendación definitiva podría hacerse (Lacroix et al., 2001).

#### **4.3.1.2 Radiación**

La radioterapia es un tratamiento eficaz que proporciona un beneficio de aumento en la supervivencia en pacientes con gliomas y se administra generalmente hasta una dosis total de 59,4 a 60 Gy durante un periodo de 6-7 semanas. Históricamente, la radioterapia se ha demostrado que mejora la supervivencia en pacientes con gliomas. Además, los pacientes con glioblastoma multiforme que recibieron dosis de radioterapia y quimioterapia con TMZ han mostrado una mejora en la supervivencia, mayor que cuando se dio radioterapia sin adyuvante (Stupp et al. 2002).

#### **4.3.1.3 Quimioterapia**

El tratamiento de los gliomas depende de su tamaño, localización, alcance de resección y grado histológico. Los agentes más comúnmente utilizados para tratar tumores cerebrales antes del desarrollo de la temozolomida fueron las nitrosoureas tal como la lomustina (CCNU) y carmustina (BCNU) que ejercen citotoxicidad a través de la alquilación del DNA, entrecruzamiento del DNA y carboximetilación. Ambos agentes tienen efectos secundarios gastrointestinales significativos, principalmente náuseas y vómitos. Estos fármacos están asociados con significativa mielosupresión. Compuestos derivados de platino tales como carboplatino y cisplatino ejercen sus efectos mediante la platinación y la creación de aductos de DNA, mientras la talidomida ha sido empleada por sus efectos anti-angiogénicos. Irinotecan y etopósido impiden la reparación del DNA: irinotecan inhibe a la topoisomerasa 1, y etopósido tiene actividad sobre la topoisomerasa 2. La procarbazona y el profármaco TMZ son agentes alquilantes que causan metilación en el DNA (Ray, 2010).

### 4.3.2 Tratamiento actual

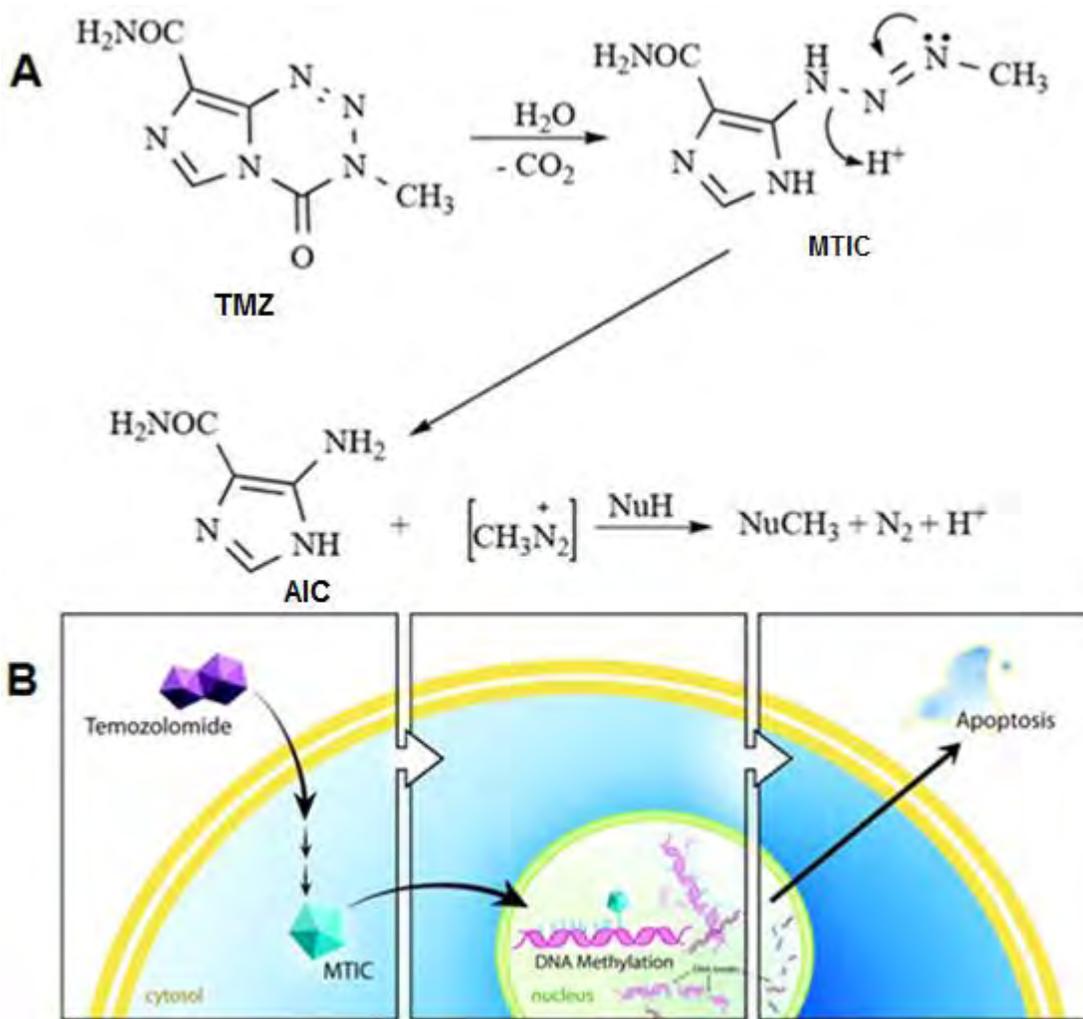
El tratamiento estándar actual para tratar glioblastomas incluye la resección quirúrgica seguida de radioterapia con tratamiento adyuvante con TMZ (Johnson, 2012 y Weller, 2014). Este tratamiento agresivo confiere un tiempo de supervivencia media de 14.6 meses en comparación con 12.2 meses para los pacientes que reciben radioterapia sola (Stupp et al., 2005).

#### 4.3.2.1 Temozolomida (TMZ)

La TMZ es una imidazoterazina derivada del agente alquilante dacarbazina, actúa como un profármaco y sufre conversión química en pH fisiológico. Se absorbe intacto rápidamente, pero a continuación, se somete a descomposición espontánea para formar monometil triazeno 5-(3-metiltriazen-1-il) imidazol-4-carboxamida (MTIC). El MTIC reacciona adicionalmente con agua para liberar 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AIC) y el catión metildiazonio altamente reactivo (Figura 1). La especie activa del catión metildiazonio metila preferentemente al DNA en las posiciones N<sup>7</sup> de la guanina, N<sup>3</sup> de la adenina y O<sup>6</sup> de la guanina. El mecanismo anterior tiene como resultado la interferencia de la replicación del DNA (Zhang, 2012).

La TMZ atraviesa la barrera hematoencefálica y biodisponibilidad céfalo-raquídea es de aproximadamente de 40% de la plasmática. Además, tiene el perfil de toxicidad hematológica más favorable. La fatiga, náuseas y vómitos también son vistos con frecuencia, pero son más leves. La TMZ en el tratamiento adyuvante se administra por vía oral a 150-200 mg/m<sup>2</sup>/día durante 5 días cada 28 días (Ray, 2010).

Aunque TMZ prolonga la supervivencia de los pacientes con glioblastoma multiforme, la recurrencia es inevitable debido al crecimiento infiltrante y la resistencia inherente al estrés genotóxico.



**Figura 1. Mecanismo de acción de TMZ.** **A.** Estructura y la activación del profármaco TMZ implica la formación de un catión metildiazonio inestable que actúa como agente alquilante. **B.** El metabolito activo (MTIC) penetra la barrera hematoencefálica y provoca la metilación de algunas bases del DNA. Además, en el proceso oxidativo que conduce a la activación del fármaco pueden formarse otros radicales libres capaces de provocar degradación del DNA e incluso roturas cromosómicas, lo cual puede llevar a la célula a apoptosis. *AIC*: 5-aminoimidazol-4-carboxamida;  $[\text{CH}_3\text{N}_2^+]$ : catión metildiazonio;  $\text{H}^+$ : ion hidrógeno; *MTIC*: monometil triazeno 5-(3-metiltriazen-1-il) imidazol-4-carboxamida;  $\text{N}_2$ : Nitrógeno molecular; *Nu*: centro nucleofílico sobre DNA y *TMZ*: Temozolomida. Modificado de Zhang, 2012 y Wesolowski, 2010.

### **4.3.3 Inmunoterapia**

La inmunoterapia está diseñada para ayudar al sistema inmune a reconocer y destruir las células tumorales con el fin de eliminar gran parte tumor (Ray, 2010). Además, estrategias inmunoterapéuticas tienen la ventaja adicional de que un sistema inmune activado tiene la capacidad de reconocer a las células tumorales en sitios distantes del tumor primario. Los modelos preclínicos y ensayos clínicos han demostrado que a pesar de su ubicación dentro del SNC, los tumores cerebrales pueden ser efectivamente tratados mediante la activación del sistema inmune después de varias estrategias inmunoterapéuticas (Ray, 2010). Algunas estrategias inmunoterapéuticas han sido usadas contra gliomas con resultados prometedores, entre ellos se incluyen la terapia génica de citocinas para potenciar la inmunogenicidad de células derivadas de glioma y la vacunación activa basada en células dendríticas para estimular la inmunidad sistémica tumoricida de células T (Pineda, 2005).

En este trabajo se evaluó el efecto de un agente inmunomodulador, denominado Factor de Transferencia (FT) el cual ha demostrado grandes beneficios en diferentes neoplasias malignas (Medina-Rivero, 2014).

## **4.4 Factor de Transferencia**

### **4.4.1 Definición**

El factor de transferencia es un medicamento de origen biológico, que consiste en un extracto dializable de leucocitos humanos (DLE). Los DLEs son una mezcla heterogénea de péptidos de bajo peso molecular (<10 kDa), que se liberan después del rompimiento del paquete de leucocitos o “buffy coat” de una unidad de sangre para donación (aproximadamente 450 mL) o células linfoides obtenidas del bazo, seguida de un proceso de diálisis donde se obtiene la fracción de bajo peso molecular que se dializa (Estrada, 1998, Flores-Sandoval, 2005 y Navarro-Cruz, 1996).

Los DLEs se describieron por primera vez en 1949 por Sherwood Lawrence. Estos tienen la capacidad de transferir inmunidad celular específica y la

de expresar hipersensibilidad de tipo retardada (DTH) de donadores inmunes a receptores no inmunes (Gottlieb, 1980 y Lawrence, 1974). La DTH es un ensayo *in vivo* de la respuesta inmune dependiente de las células T que se manifiesta como una reacción inflamatoria que alcanza su máxima intensidad desde 24 hasta 48 horas después del reto antigénico. Las mediciones directas de DTH se obtienen fácilmente en el hombre, conejillos de indias o ratones (Yi Lou, 2001).

Los DLEs se producen y comercializan en todo el mundo. En México, China, Cuba y la República Checa, los DLEs están registrados como medicamentos (Pineda, 2005). En el caso del Factor de Transferencia (Transferón<sup>®</sup>), producido en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (ENCB/IPN), las moléculas están comprendidas en un rango de 1,000 a 12,000 Da (Medina-Rivero, 2014). El material biológico que se utiliza para la preparación del FT, en la ENCB/IPN, es proporcionado por diferentes bancos de sangre certificados de la Ciudad de México, y se obtiene a partir de donadores de sangre sanos, los paquetes celulares son sometidos a diferentes pruebas biológicas todas ellas descritas en la Norma Oficial Mexicana: NOM-003-SSA2-1993. Por considerarse un hemoderivado y ser un inmunorregulador, en diferentes padecimientos de humanos, la fabricación del FT, debe someterse a la NOM-059-SSA1-2013.

#### **4.4.2 Obtención**

El FT puede obtenerse de leucocitos de sangre periférica, bazos, ganglios linfáticos y placenta de diferentes especies como ratas, ratones, bovinos, perros, monos, burros, gatos, conejos, y también humanos. Se pueden producir DLEs polivalentes, los cuales serán capaces de transferir tantas respuestas celulares como respuestas positivas presentes en el donador de donde se obtuvieron las células o DLEs antígeno específico mediante la inmunización de cualquiera de las especies antes mencionadas.

El procedimiento de obtención del FT es una modificación del descrito por Lawrence (Lawrence, 1981) para obtener DLEs polivalentes. Se parte de un “pool” de leucocitos lisados obtenidos a partir de donadores sanos, el número de

donadores es en promedio de 1000 por lote. Las células lisadas se someten a un proceso de diálisis empleando una membrana con un corte molecular de 1-12 kDa. Posteriormente se concentra, formulan y finalmente se filtran por una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ , previo envasado. El producto terminado es sometido a las pruebas de control de calidad.

#### **4.4.3 Estructura química y componentes**

En 1962, Baram y Mosko utilizaron cromatografía de fase reversa para demostrar que los DLEs son una mezcla heterogénea de péptidos de bajo peso molecular que comprenden diversas fracciones cromatográficas. Utilizando *size exclusion chromatography* (SEC), este grupo de investigación también observó que los DLEs generaban 10 picos cromatográficos, donde la fracción correspondiente al quinto pico mostró contener moléculas con peso molecular por debajo de 10 kDa, la cual albergaba la mayoría de los efectos biológicos (Baram, 1996 y Paque, 1969).

Rozzo et al., purificaron un FT específico por técnicas como cromatografía de fase reversa y HPLC, a partir de DLEs de ratones que fueron inmunizados con albúmina de huevo y ferritina de caballo. Ellos observaron que los FTs son moléculas hidrofílicas altamente polares, pesan alrededor de 5 kDa y se encuentra dentro de los componentes de los DLEs (Rozzo y Kirkpatrick, 1992).

Varios investigadores observaron mediante diferentes métodos cromatográficos, que subfracciones específicas mediaban los efectos de los DLEs (Vandenbark et al., 1977, Burger et al., 1979 y Khan et al., 1980). Adicionalmente, observaron que la fracción activa era susceptible a las proteasas (Burger et al., 1979) y sus propiedades fisicoquímicas sugirieron un alto contenido proteico (Khan et al., 1980). En un análisis adicional de las fracciones activas de los DLEs, los aminoácidos más abundantes fueron glicina, serina, y glutamato, mientras que lisina y los aminoácidos aromáticos fueron los menos abundantes (Borvak, 1990). Kirkpatrick et al., proporcionaron evidencia de que el contenido peptídico mediaba la actividad biológica en los DLEs. Se fraccionaron los DLEs por HPLC en fase

reversa y se encontró la siguiente secuencia en los péptidos aislados: AUGxCUUCUUUAUGCUCAAGAUCUU/GUUGAAGAUAAU (Kirkpatrick, 2000).

En conjunto, estos reportes demuestran que los DLE son una mezcla heterogénea de péptidos polares e hidrófilos (> 200) con pesos moleculares por debajo de 10 kDa. Su complejidad, sin embargo, ha impedido una extensa caracterización de sus componentes, sustancias activas, y actividades biológicas (Pineda, 2005).

Los factores de transferencia pueden ser purificados con un alto grado de homogeneidad (Rozzo, 1992 y Medina-Rivero, 2014). Constan de dos fracciones: la fracción antígeno específica que está compuesta por moléculas de naturaleza peptídica de un peso molecular aproximadamente de 5 kDa. En ella se encuentran los factores de transferencia específicos, que son capaces de transmitir inmunidad celular, estos factores de transferencia son la suma de las experiencias inmunes del individuo de donde se ha obtenido el extracto. La fracción antígeno inespecífica está compuesta por fracciones de moléculas inmunomoduladoras (con peso molecular <3 kDa) como la histamina, nicotinamida, factores de diferenciación de linfocitos (timosina), quimioatrayentes para monocito, ácido ascórbico, entre otros (Franco-Molina, 2005).

#### 4.4.4 Actividad inmunológica

Desde su descubrimiento se han observado diferentes efectos de los DLEs ya sea en modelos *in vitro* o modelos *in vivo*. En la tabla 2 se describen algunos hallazgos de la acción de estas moléculas en diferentes modelos.

Cabe destacar que las respuestas que se presentan no siempre son las mismas, ya que depende del tipo celular y del modelo que se esté empleando.

**Tabla 1. Actividades inmunológicas producidas por el FT.**

MODELO	EFEECTO INMUNOLÓGICO	INVESTIGADOR	AÑO
<i>In vitro</i> , células humanas.	Proliferación de linfocitos específicos para tuberculina.	Fireman	1967

<i>In vitro e in vivo</i> en monos Rhesus.	Actividad quimiotáctica para neutrófilos y monocitos.	Gallin y Kirkpatrick	1974
<i>In vitro</i> , pacientes con sarcoma.	Producción de células T citotóxicas específicas para células de sarcoma osteogénico.	Levin et al.	1975
<i>In vitro</i> , células humanas.	Aumento en la capacidad de respuesta a mitógenos por parte de los linfocitos.	Petersen y Kirkpatrick	1979
<i>In vitro</i> , células humanas.	Inhibición de la migración leucocitaria antígeno específica.	Borkowsky y Lawrence	1979
<i>In vitro</i> , células humanas.	Identificación de una molécula por debajo de 3.5 kDa que actúa revirtiendo la inhibición de la migración de macrófagos que produce el DLE.	Farmer et al.	1984
<i>In vitro</i> , macrófagos humanos.	Induce la producción de IL-1 y la activación de macrófagos.	Dorfling et al.	1987
<i>In vitro</i> , células periféricas mononucleares humanas.	Incremento de DTH y del receptor para IL-2 (CD25) en células CD4 <sup>+</sup> .	Gottlieb et al.	1995
<i>In vitro</i> , células de bazo de ratón.	Secreción de IFN- $\gamma$ y de IL-2, específicas de antígeno.	Álvarez y Kirkpatrick	1995
<i>In vitro</i> , células T humanas de leucemia.	Inhibición de la replicación del virus de VIH de manera dosis dependiente.	Fernández-Ortega	1995
<i>In vitro</i> , monocitos aislados y en sangre total.	Inhibición de la producción de TNF- $\alpha$ en células activadas con LPS.	Fernández-Ortega	1995
<i>In vivo</i> , ratones sensibilizados con DLEs específicos.	Producción de IFN- $\gamma$ .	Kirkpatrick	1995
<i>In vitro</i> , células de médula ósea y ratón.	Incrementa la sensibilidad de células progenitoras hematopoyéticas al tratamiento con GM-CSF.	Vacek et al.	1997
<i>In vivo</i> , modelo	Favorece la rápida recuperación de la	Vacek et al.	2000

en ratón con DLEs humanos.	hematopoyesis posterior a la radiación. Estimula el crecimiento de células progenitoras hematopoyéticas para granulocitos y macrófagos.		
<i>In vivo</i> , modelo murino de infección con <i>M. tuberculosis</i> .	Incremento en la sobrevivencia de los ratones infectados, favorece un perfil de citocinas Th1, aumento de IFN- $\gamma$ e IL-2, disminución de IL-4, combinado con tratamiento antifímico acelera la disminución de áreas neumónicas, así como un incremento en la DTH.	Fabré et al.	2004
<i>In vivo</i> , modelo murino.	DLEs bovinos protegen contra el choque endotóxico causado por LPS.	Moisés et al.	2004
<i>In vivo</i> , modelo de shock endotóxico murino.	Los DLEs bovinos suprimen la IL-10 e IL-6, y disminuyen la expresión del mRNA de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , y la IL-12 $\beta$ . Además, promueven la disminución en la producción de IL-10, TNF- $\alpha$ e IL-6 en ratones con shock endotóxico inducido por LPS, en sangre total murina.	Franco-Molina	2004
<i>In vitro</i> , leucocitos y células endoteliales.	La adición de DLEs a leucocitos estimulados con constituyentes de la pared bacteriana suprime la producción de TNF- $\alpha$ . Sin embargo, los DLEs inducen la liberación de IL-8 en monocitos y potencian la producción de IL-6 e IL-8 en monocitos activados y células endoteliales. También inducen la expresión de TLR2 y TLR4 e incrementan los niveles de cAMP, mientras que inhiben la actividad de NF-KB.	Ojeda et al.	2005
<i>In vivo</i> , modelo de glioma C6 murino.	Los factores de transferencia bovinos redujeron significativamente el tamaño del tumor, aumentaron el número de células CD2 $^{+}$ , CD4 $^{+}$ , CD8 $^{+}$ y NK, también aumentaron el porcentaje de células tumorales	Pineda et al.	2005

	apoptóticas y el porcentaje de tejido tumoral que expresó citocinas Th1. También se observó un aumento significativo de la citocina IL-10.		
<i>In vivo</i> , macrófagos peritoneales murinos.	En células estimuladas con LPS, los DLEs bovinos disminuyen la producción de TNF- $\alpha$ e IL-6 y un aumento de la IL-10.	Franco-Molina et al.	2005
<i>In vivo</i> , sangre completa humana.	Los DLEs disminuyen la producción de Óxido Nítrico, así como la producción de las citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10. Adicionalmente, disminuyen la expresión del mRNA de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-6 y suprime la expresión del mRNA de IL-10 e IL-12 $\beta$ , también modulan la expresión del mRNA de IL-8 en sangre completa humana.	Franco-Molina	2007
<i>In vivo</i> , modelo aviar.	Los DLEs aviares inducen la expresión del mRNA de IFN- $\gamma$ e IL-2 en pollos vacunados contra influenza aviar.	Cobos-Marín et al.	2010

Modificado de Bernal-Pérez, 2010

#### 4.4.5 Aplicaciones

Desde el descubrimiento de los factores de transferencia por Lawrence 60 años atrás (Lawrence, 1955), muchos reportes clínicos han establecido sus utilidades como un inmunomodulador en diversas enfermedades. Probablemente, los DLEs tengan una gran aplicación clínica por estar compuestos de una amplia gama de moléculas que otorgan diferentes funciones efectoras dependiendo de la enfermedad. En la tabla 2 se mencionan algunas de las aplicaciones clínicas del FT.

Tabla 2. Aplicaciones clínicas del FT.

CLASIFICACIÓN		ENFERMEDAD
Hipersensibilidad		Asma bronquial Dermatitis atópica Síndrome de Hiper IgE Alergias
Enfermedades Infecciosas	Hongos	Candidiasis mucotánea crónica Histoplasmosis diseminada Coccidioidomicosis diseminada
	Virus	Citomegalovirus Herpes zoster Sarampión Varicela Hepatitis
	Bacterias	Tuberculosis Lepra Micobacteriosis por <i>M. avium</i> Brucelosis Gram positivas Gram negativas
	Protozoarios	Leishmaniasis cutánea
Inmunodeficiencias		Síndrome de Wiskott-Aldrich Ataxia telangiectasia Síndrome de inmunodeficiencia severa combinada Síndrome parcial de Di George Disgamaglobulinemia con defectos en inmunidad celular
Neoplasias		Melanoma Cáncer de estómago Cáncer de próstata Cáncer de pulmón Cáncer de colon Osteosarcoma Hipernefroma Cáncer de mama Carcinoma nasofaríngeo
Enfermedades autoinmunes		Lupus eritematoso crónico discoide Síndrome de Behcet

## 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El glioblastoma es el tipo de tumor intracraneal más frecuente y agresivo en adultos. Debido a su malignidad la sobrevida de los pacientes es muy corta, es por eso que tiene gran relevancia el estudio de terapias que pudieran mejorar la calidad de vida del paciente.

Se sabe que la presencia de un tumor provoca la reacción del sistema inmune orientada a eliminar la amenaza que desencadena el desarrollo del mismo. En el glioblastoma existen diferentes mecanismos por los cuales se puede provocar un estado de inmunosupresión que dificulta el desarrollo de una reacción inmunitaria eficaz. Así que la utilización del sistema inmune como estrategia terapéutica para disminuir el desarrollo de los astrocitomas de alto grado constituye un campo de investigación importante. En este trabajo se estudió el efecto de un medicamento con propiedades inmunomoduladoras (FT) sobre el desarrollo de glioblastoma en un modelo *in vivo* y un modelo *in vitro*.

## 6. HIPÓTESIS

Si el FT tiene la capacidad de modular la respuesta del sistema inmune entonces se espera que haya una disminución en la viabilidad de una línea celular derivada de glioblastoma, así como una reducción en el tamaño del tumor desarrollado en la corteza motora de la rata.

## 7. OBJETIVOS

### 7.1 Objetivo General

- Evaluar el efecto del FT en el desarrollo de glioblastomas humanos.

### 7.2 Objetivos Particulares

- Evaluar la viabilidad de una línea celular (U87) derivada de un glioblastoma expuesta a diferentes dosis de FT.
- Implantar células U87 en la corteza motora de ratas macho, con el fin de inducir la formación de un tumor.
- Determinar el efecto del FT en la migración de células y en el tamaño del tumor formado en la corteza motora de ratas macho.

## **8. METODOLOGÍA**

### **8.1 Cultivo celular**

Se cultivó la línea celular U87 (derivada de un hombre de 44 años diagnosticado con glioblastoma) en medio DMEM con rojo fenol suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, piruvato 1 mM y aminoácidos no esenciales. Esta línea celular se transfectó establemente con el transgen para la GFP. Por esto nos referiremos a la línea celular como U87-GFP. Todos los cultivos se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y 95% de humedad. El medio se cambió cada 48 horas hasta alcanzar una confluencia celular de 70 – 80%. Una vez obtenida dicha confluencia, se contó el número de células en una cámara de Neubauer, se separaron 250,000 células y se centrifugaron a 3,500 rpm durante 3 minutos.

### **8.2 Ensayo *in vitro***

#### **8.2.1 Efecto de FT en la viabilidad celular**

Se sembraron 1500 células U87 por pozo en placas de 96 pozos, de fondo plano, en un volumen de 100 µL de medio DMEM, una placa suplementada con SFB al 10% y otra sin SFB. Las células se trataron con las siguientes concentraciones de FT: 1, 10, 100 pg/mL, 1, 10, 100 ng/mL y 1 µg/mL, se incubaron durante 2h, a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Después de esta incubación con FT, la determinación de la viabilidad celular se realizó mediante la reducción de una sal de tetrazolio (MTS) a las 24, 48, 72 y 96h de cultivo. Brevemente, se agregaron 20 µL de MTS a cada pozo y se incubaron las placas durante 2h. Transcurrido este tiempo se leyó la absorbancia a 490 nm con un lector de placas EPOCH. Se utilizó medio DMEM sin suspensión celular como blanco. Este ensayo se realizó por triplicado en tres experimentos diferentes. Las dosis utilizadas fueron elegidas de acuerdo a lo reportado en la literatura utilizando células derivadas de cáncer de próstata (Hernández, 2015).

### **8.3 Ensayo *in vivo***

#### **8.3.1 Implante de células tumorales en la corteza motora de rata**

Se trabajó con ratas macho adultas de la cepa Wistar de 250 – 300 g de peso, las cuales se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad 12:12 con agua y alimento *ad libitum*. Cada rata se anestesió con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (30 mg/kg) y se colocó en el aparato estereotáxico. Se desinfectó la parte superior de la cabeza del animal con un algodón empapado con iodopovidona y se rasuró el área. Posteriormente se realizó una incisión en dirección anteroposterior y se retrajo el tejido. Se goteó un poco de agua oxigenada sobre el cráneo y se raspó con el bisturí para retirar el tejido conectivo del mismo. Se localizaron las coordenadas 1.6 mm anterior y 3 mm lateral izquierdo con respecto a Bregma correspondientes a la corteza cerebral motora y se realizó un trépano en ese sitio. Posteriormente se insertó una cánula, la cual estaba conectada a una microjeringa que contenía 200,000 células U87-GFP resuspendidas en 2 µL de medio DMEM y éstas se inyectaron a lo largo de 2 minutos a través de la cánula. Se dejaron pasar 5 minutos para permitir el asentamiento de las células implantadas y se extrajo la cánula. Se colocó cera para hueso suficiente para cubrir el sitio de trepanación. Finalmente, se goteó gentamicina sobre la superficie craneal para evitar posibles infecciones y se suturó la piel. El animal se dejó en recuperación con alimento y agua *ad libitum*. El antibiótico enrofloxacin (10 mg/kg) fue agregado al agua de beber durante las siguientes 48 horas. Para disminuir la inflamación, se les administró meloxicam (0.85 mg/kg) vía intraperitoneal durante dos días después de la cirugía. Todos los procedimientos fueron realizados bajo el régimen del Código ético para el uso y cuidado de animales de laboratorio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía y bajo la Norma Mexicana para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

#### **8.3.2 Tratamientos**

De manera aleatoria se formaron 2 grupos experimentales con 3 animales cada uno y se realizaron los siguientes esquemas de tratamiento:

Grupo 1: Solución salina isotónica 0.9%

Grupo 2: FT

Los tratamientos iniciaron 7 semanas después del implante de las células U87-GFP. Finalizados los tratamientos se administró el FT. Se tomaron 30  $\mu$ L del frasco del FT (2 mg de proteína/5 mL excipiente) y se diluyeron en 500  $\mu$ L de solución salina isotónica (SSI) para administrar vía oral a través de una cánula. En la tabla 3 se representa el esquema de administración que se llevó a cabo.

**Tabla 3. Esquema de administración de los tratamientos.**

DÍA \ GRUPO	1-5	7	11	15	19	23
I	SSI	SSI	SSI	SSI	SSI	SSI
II	12 $\mu$ g FT					

Este esquema es el que la ENCB/IPN propone para un problema agudo en humanos. La dosis en los animales se ajustó de acuerdo a lo estipulado por Reagan-Shaw et al. (Reagan-Shaw et al., 2008) y por la guía de dosificación estipulada por la FDA.

### 8.3.3 Inmunofluorescencia

Una vez concluidas las tres semanas de tratamiento, las ratas se sacrificaron mediante la administración de una sobredosis de pentobarbital sódico (122 mg/Kg) vía intraperitoneal. Cuando se observó el efecto analgésico, y antes de que el corazón dejara de latir, las ratas se perfundieron con 500 mL de solución salina y 500 mL de formalina (solución de formaldehído al 4% y cloruro de sodio al 0.81% en agua desionizada), posteriormente se extrajeron los cerebros, los cuales se mantuvieron en frascos con la misma solución de formalina.

Para retirar el exceso de formalina, los cerebros se sometieron a 3 diferentes gradientes de sacarosa (10%, 20% y 30%), las cuales fueron sustituidas cada 24 horas.

Se realizaron cortes del cerebro de cada rata a la altura del implante de las células U87-GFP, con 15  $\mu\text{m}$  de grosor a una temperatura de 4°C con un criostato (Leica CM1850). Los cortes se montaron en portaobjetos que se mantuvieron a temperatura ambiente.

Para la detección del marcador de las células tumorales U87 (GFP) y del marcador de viabilidad Ki-67, se bloquearon los cortes cerebrales con albúmina sérica bovina al 5% en solución Tween-TBS 0.1% durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se le agregaron los anticuerpos primarios rabbit anti-GFP (sc-8334, Santa Cruz Biotechnology) y mouse anti-Ki67 (sc-23900, Santa Cruz Biotechnology), con una concentración de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente, se incubaron durante toda la noche en refrigeración. Los anticuerpos primarios se removieron con lavados empleando una solución de Tween-TBS al 0.1%, tres veces durante 10 min en agitación. Enseguida se adicionaron los anticuerpos secundarios correspondientes: anti-rabbit (1:1000) acoplado a Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 goat y anti-mouse (1:6) acoplado a Alexa Fluor<sup>®</sup> 594 goat, cuyo tiempo de incubación fue de 1 h a temperatura ambiente en oscuridad. Para teñir los núcleos, las muestras se lavaron con Tween-TBS al 0.1%, tres veces durante 10 min y se añadió el marcador DAPI durante 7 min a temperatura ambiente en oscuridad, se lavaron ligeramente en solución de Tween-TBS al 0.1% para remover el exceso de DAPI. Finalmente, las laminillas se montaron con un medio no fluorescente y se visualizaron en el microscopio Olympus Bx43. La distancia recorrida por las células se observó en el objetivo 10X, mientras que el tamaño del tumor se observó en el objetivo 20X. Las imágenes generadas al observar las laminillas en el microscopio se utilizaron para medir el área del tumor y la migración de las células tumorales. Las imágenes generadas por inmunofluorescencia se analizaron con el programa Image-Pro Plus 7.0 (MediaCybernetics), en el que se midió el área del tumor y la migración de las células tumorales.

#### **8.4 Análisis estadístico**

El análisis estadístico se llevó a cabo en el programa GraphPad Prism 4, donde se hicieron las pruebas correspondientes para calcular los valores de probabilidad. Las pruebas se realizaron con un intervalo de confianza del 95%, por lo que todos aquellos datos que tuvieron una  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente diferentes.

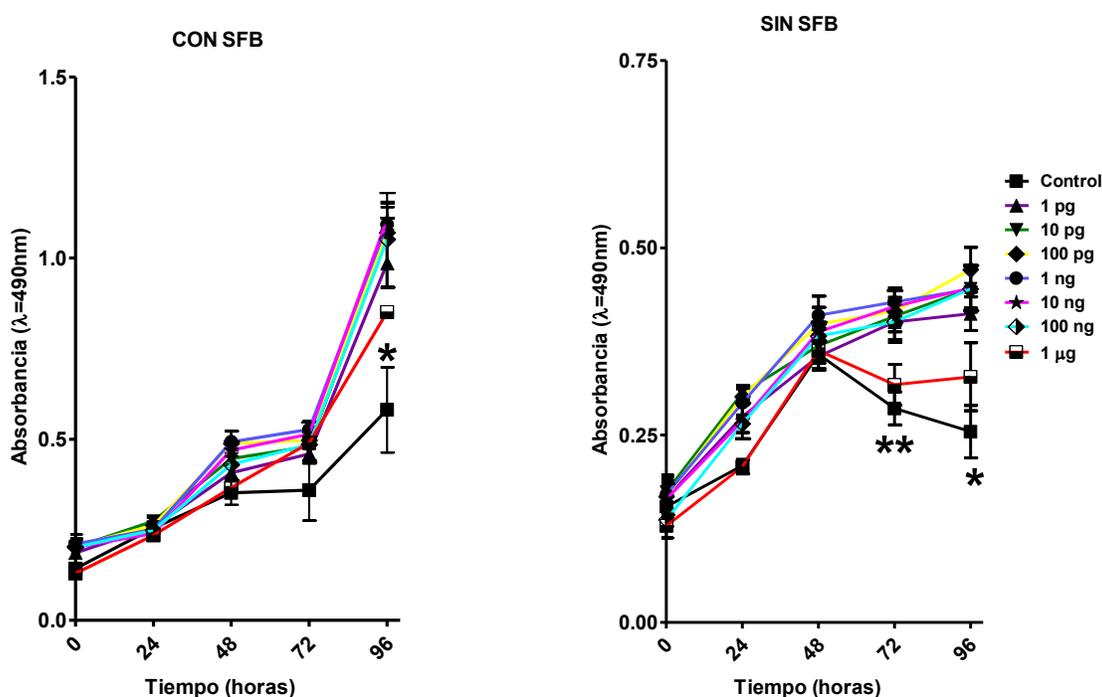
En los ensayos *in vitro*, se realizó el análisis estadístico con una ANOVA seguida de la prueba no paramétrica de Bonferroni. Los tratamientos se compararon con el control.

Los resultados obtenidos por inmunofluorescencia se analizaron a través de la prueba no paramétrica Mann-Whitney para comparar los tratamientos con el control.

## 9. RESULTADOS

### 9.1 Evaluación del FT en la viabilidad de la línea celular U87

En la figura 2 se observó que no hubo un cambio significativo en el número de células hasta las 48 horas de incubación en medio suplementado y en el medio ausente de SFB. Hasta este tiempo, no se observó un efecto del FT sobre la viabilidad celular. Para las 96 horas (Fig. 2A) se observó un aumento (\* $p < 0.001$ ) en la viabilidad con respecto al control con todas las concentraciones de FT empleadas.



**Figura 2. Efecto del FT en la viabilidad de células U87-GFP.** Resultados de la viabilidad de la línea celular U87-GFP tratadas con diferentes concentraciones de FT (1, 10, 100 pg/mL, 1, 10, 100 ng/mL y 1 µg/mL) en el transcurso de 5 días. **A.** Viabilidad celular en medio DMEM suplementado con SFB. **B.** Viabilidad celular en medio DMEM sin SFB. Los resultados se muestran como media  $\pm$  error estándar del promedio (EEP). La significancia estadística en comparación con el control fue de \* $p < 0.05$  vs el resto de los tratamientos del mismo día y \*\* $p < 0.05$  vs el resto de los tratamientos del mismo día, excepto 1 µg.

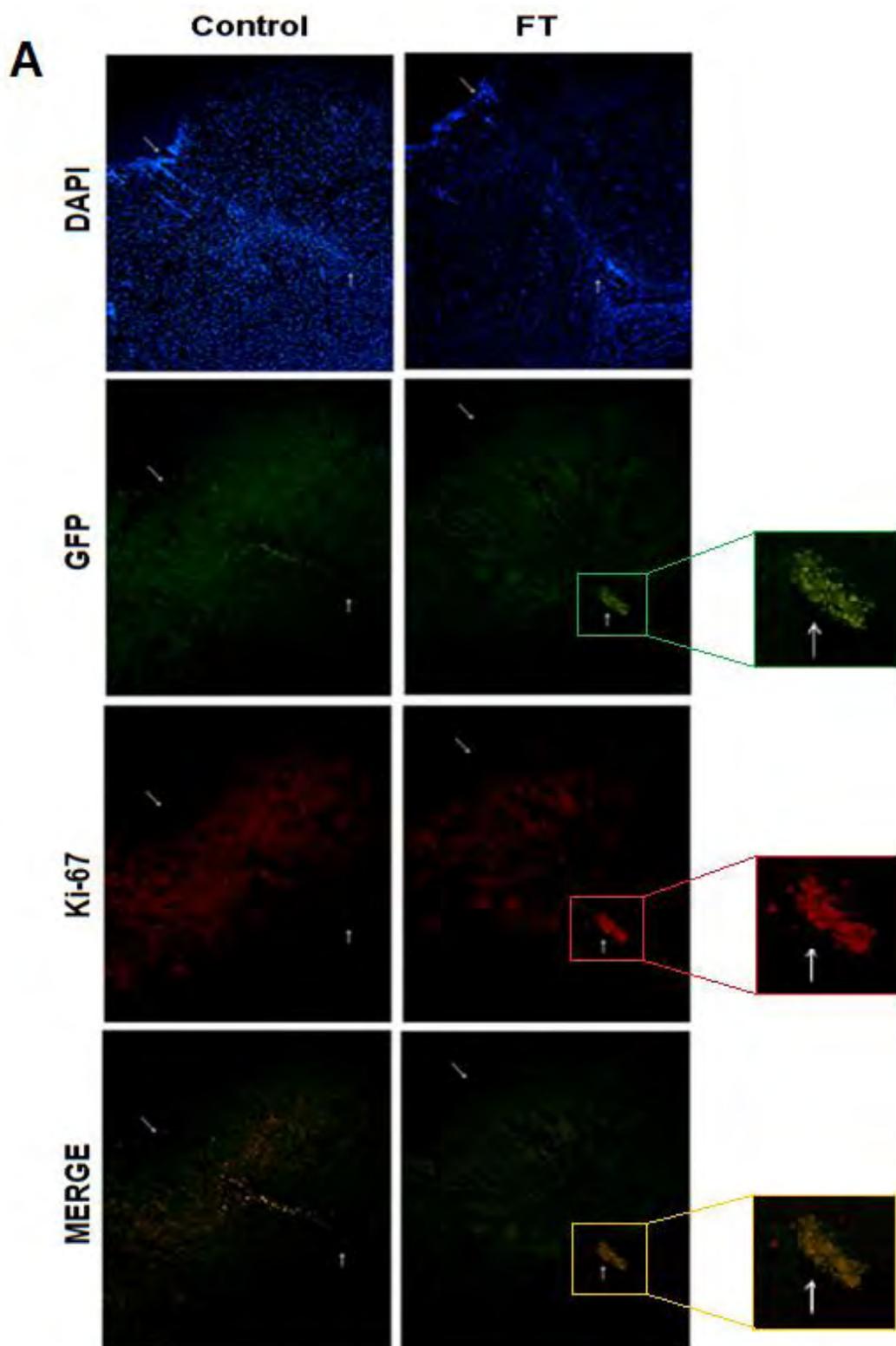
El mismo efecto se vio en la figura 2B, sin embargo las células tratadas con FT aumentaron su viabilidad a partir de las 76 horas con todas las concentraciones utilizadas excepto la de 1 µg/mL. A las 96 horas, todas las concentraciones fueron estadísticamente diferentes (\*p<0.001) con respecto al control.

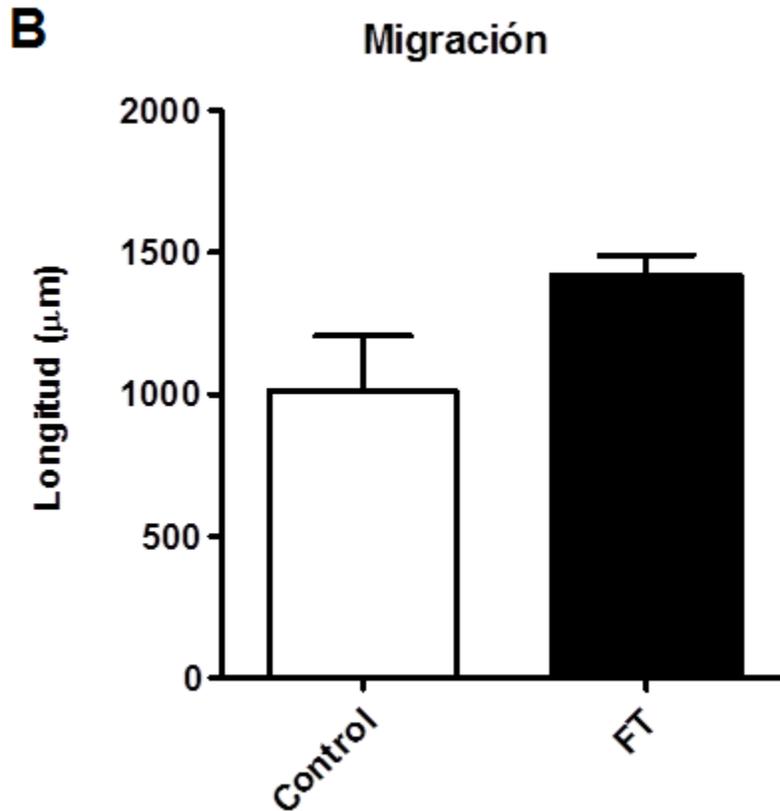
Mediante el ensayo de MTS se evaluó la viabilidad de la línea celular U87-GFP, donde se probaron diferentes concentraciones del FT (1, 10, 100 pg/mL, 1, 10, 100 ng/mL y 1 µg/mL) y se observó el efecto de este fármaco en el transcurso de 5 días. También se evaluó el efecto de suplementar el medio con SFB, para verificar que el efecto sobre la viabilidad se debía al fármaco y no a la ausencia de SFB.

### **9.3 Influencia del FT en la migración de las células U87 implantadas en la corteza motora de rata.**

Para determinar si el FT tenía un efecto en la migración de las células U87-GFP implantadas en la corteza prefrontal de la rata, se analizó la expresión de la GFP, así como la expresión del marcador de viabilidad Ki-67. En la figura 3A se observó que la migración de las células en los cortes cerebrales de ratas no tratadas, es similar a la presentada por las células en los cortes donde las ratas si fueron tratadas con FT. En la figura 3B se observa que no hubo diferencias estadísticas en la migración de las ratas tratadas con el FT comparadas con el control.

Mediante el programa Image-Pro Plus 7.0 (MediaCybernetics) se midió la distancia recorrida por las células U87-GFP, desde el sitio de implantación hasta donde comenzaron a formar el tumor.



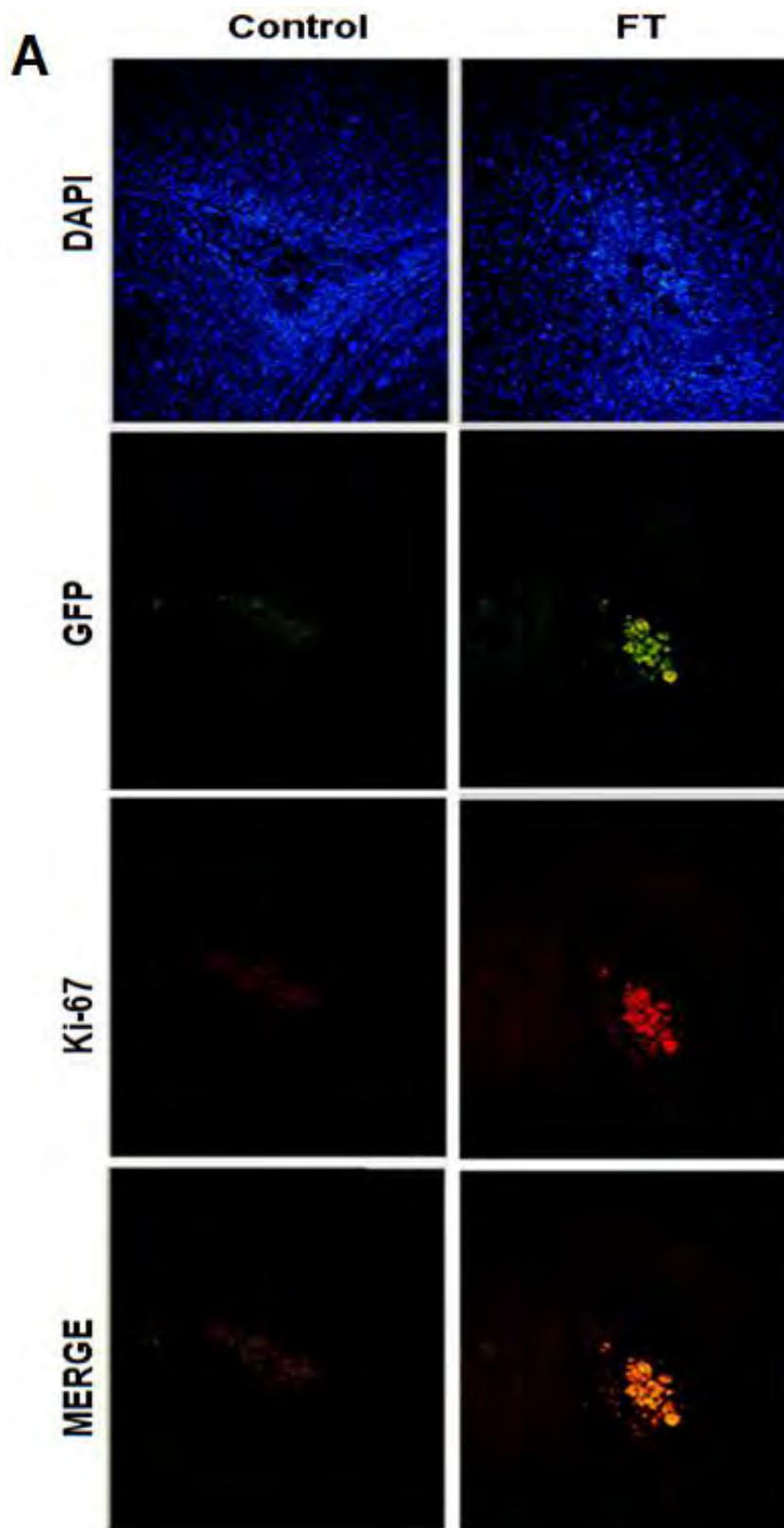


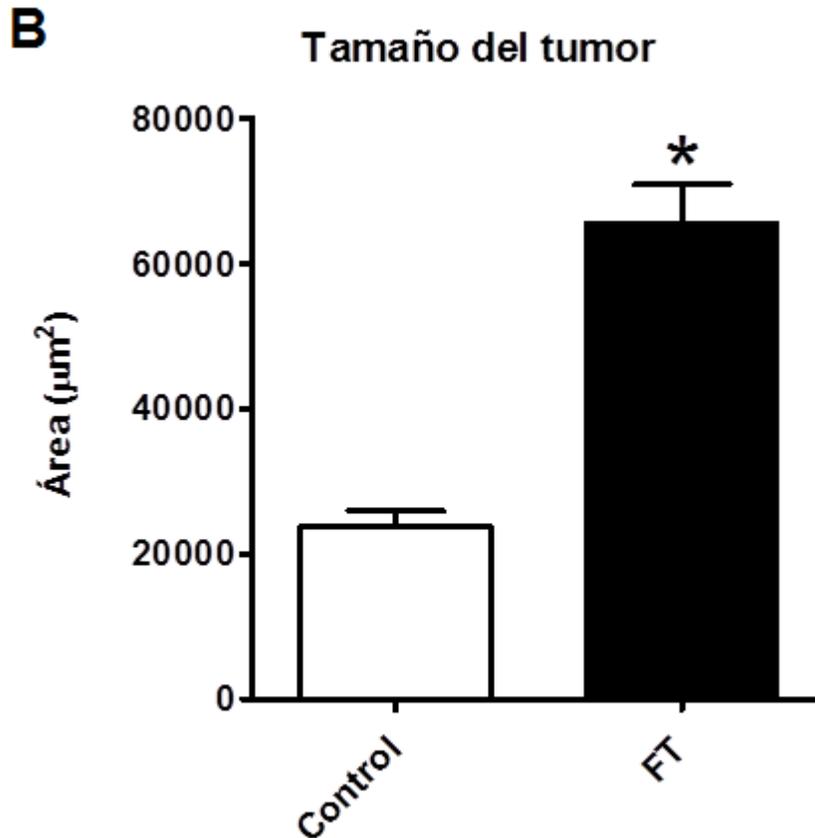
**Figura 3. Efecto del FT en la migración de las células U87 implantadas en la corteza motora de rata.** Resultados de la migración de células U87-GFP en cortes cerebrales de ratas que fueron tratadas con FT (12µg) durante tres semanas. **A.** Migración de las células U87-GFP (Objetivo 10X) (DAPI en azul, GFP en verde, Ki-67 en rojo y el sobrelape de las proteínas en naranja) en los cortes cerebrales de rata. Las flechas blancas en la parte superior de las fotografías indican el lugar de implantación de las células, mientras que las flechas blancas en la parte inferior indican punto final recorrido por las células. **B.** Representación gráfica del efecto del FT en la migración de células U87. Los valores se muestran como la media de tres experimentos independientes  $\pm$  EEP.

#### **9.4 Influencia del FT en el tamaño del tumor formado a partir de células U87 implantadas en la corteza motora de rata.**

Se puede observar una diferencia en el tamaño del tumor formado por las células tumorales en los cortes de las ratas que fueron o no tratadas con FT. El tamaño del tumor es mayor en las ratas que se trataron con FT comparadas con el control (Figura 4A). Es posible observar una acumulación de las células formando un tumor con zonas bien delimitadas. En la figura 4B se aprecia que sí hay diferencias significativas ( $*p < 0.001$ ) en el área del tumor cuando las células son tratadas con FT con respecto al control.

Se midió el área del tumor formado por células U87-GFP en diferentes cortes utilizando el mismo programa (Image-Pro Plus 7.0), utilizado para medir la migración celular.





**Figura 4. Efecto del FT en el tamaño del tumor formado por las células U87 implantadas en la corteza motora de rata.** Área del tumor formado por el implante de células U87-GFP, en cortes cerebrales de ratas que fueron tratadas con FT (12 µg) durante tres semanas. **A.** Área del tumor formado observada a través de la expresión de diferentes marcadores (GFP, Ki-67 y DAPI) en los cortes cerebrales de rata. Las imágenes se muestran en un aumento de 20X. **B.** Representación gráfica del efecto del FT en el tamaño del tumor formado por células U87-GFP. Los valores se muestran como la media de tres experimentos independientes ± EEP. La significancia estadística en comparación con los controles fue de \*p <0.05.

## 10. DISCUSIÓN

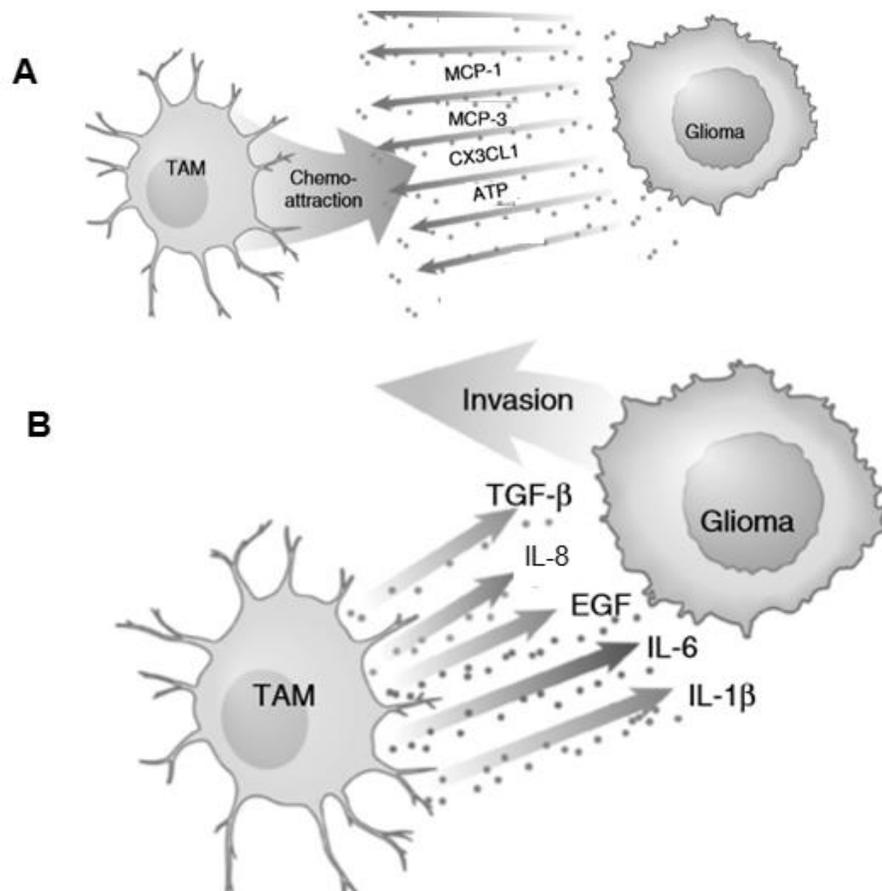
El objetivo de este trabajo fue determinar si el FT, un medicamento indicado para distintos padecimientos, era una opción viable para administrarlo como terapia adyuvante en el tratamiento de glioblastomas.

La viabilidad celular de la línea U87 fue significativamente mayor cuando las células tumorales se incubaron de 72 a 96 horas con FT (Figura 2).

Simultáneamente se evaluó el efecto de este medicamento en ratas con células derivadas de glioblastomas implantadas en la corteza motora de ratas macho, lo anterior basado en el hecho de que el microambiente del tumor es fundamental para que las células tumorales puedan adquirir nutrientes y factores de crecimiento que les permita seguir proliferando e invadiendo tejidos sanos. Para observar el efecto del FT en este modelo, se evaluó la migración de las células U87 y el tamaño del tumor formado. Los resultados indican que el FT es capaz de aumentar el tamaño del tumor, mientras que la migración de las células no depende de este estímulo para infiltrar a zonas más profundas (Figura 3).

Es importante tener en cuenta los mecanismos por los cuales el glioblastoma es capaz de evadir el sistema inmune. La inestabilidad genética de los tumores y su exposición repetida a presiones selectivas inmunes aumentan el potencial de la selección de variantes de células tumorales con una mayor capacidad para evadir el ataque del sistema inmune (Ray, 2010). Aunado a eso, gran parte de las células que constituyen al tumor (35-50%), son microglia y macrófagos asociados al tumor (TAMs) que tienen la capacidad de brindarle protección al tumor para que este siga desarrollándose (Hambardzumyan, 2016). Estas células asociadas a tumor tienen la capacidad de crear un ambiente inmunodeprimido a partir de la secreción de diferentes citocinas (Figura 5), tales como, TGF- $\beta$ 1 e IL-10. La primera citocina inmunosupresora mencionada se expresa en células de glioma y también es producida por las TAMs, la cual es crucial para promover la invasión tumoral (Carvalho Da Fonseca, 2013). Por su parte, la IL-10, también es una citocina secretada por las TAMs que contribuye a

que exista un ambiente inmunodeprimido a partir de diferentes mecanismos (Ray, 2010). Otra citocina igualmente importante para progresión del tumor en gliomas es la IL-8, la cual posee propiedades tumorigénicas y proangiogénicas (Brat, 2005).



**Figura 5. Interacción entre los TAMs y el glioma. A.** Los gliomas secretan quimiocinas que favorecen en reclutamiento de los TAMs hacia el tumor. **B.** Los TAMs liberan citocinas que promueven el crecimiento e invasión tumoral. Modificado de Hambardzumyan, 2016. **ATP:** Adenosin trifosfato, **CX3CL1:** quimioquina (C-X3-C motif) ligando, **EGF:** Factor de crecimiento epidérmico, **IL-1β:** Interleucina 1 beta, **IL-6:** Interleucina 6, **IL-8:** Interleucina 8, **MCP-1:** Proteína quimiotáctica de monocitos 1, **MCP-3:** Proteína quimiotáctica de monocitos 3, **TAM:** Microglía y macrófagos asociados a tumor, **TGF-β:** Factor de crecimiento transformante beta.

Cabe mencionar que se tienen pocos estudios sobre el uso de DLEs en el tratamiento para glioblastomas. De hecho, sólo hay un estudio en el que se probaron DLEs derivados de cerdo en un modelo animal de glioma. Esta investigación reveló que este extracto dializable redujo significativamente el tamaño del tumor, aumentó el número de células CD2<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y NK, también aumentó el porcentaje de células tumorales apoptóticas y el porcentaje de tejido tumoral que expresa citocinas Th1 (Pineda, 2005). Los resultados que obtuvo este grupo de investigación no concuerdan con lo reportado en el presente estudio, sin embargo, es importante señalar que los modelos experimentales que se utilizaron para ambos estudios fueron diferentes, en su modelo ellos utilizaron células de glioma C6 murino que fueron implantadas subcutáneamente en el muslo izquierdo de la rata, a diferencia del nuestro que se implantó directamente en la corteza motora de los animales experimentales. Las dosis que se utilizaron en ambos modelos no son comparables debido a que ellos utilizaron los lisados de cierto número de células, sin tomar en cuenta el contenido proteico obtenido de este lisado y fueron administrados vía intratumoral, mientras que en nuestro modelo se utilizó una dosis fija (12 µg de FT) administrado por vía oral. Puede ser que las diferencias que se observaron fueron debido a que el FT se administró por diferentes vías. Además, el microambiente en el cerebro es diferente al del músculo, como ya se mencionó las TAMs liberan citocinas que pueden inducir el crecimiento del tumor. En ese mismo reporte también se encontró una alta expresión de la citocina IL-10. En otro trabajo se reportó que los DLEs bovinos son capaces de aumentar la producción de IL-10 en macrófagos peritoneales murinos (Franco-Molina, 2005). Sin embargo, en otros reportes del mismo grupo de trabajo ha observado una disminución de la IL-10, al utilizar otros modelos.

Adicionalmente, se ha demostrado que en gliomas hay diferentes subpoblaciones de macrófagos, los cuales son activados dependiendo de las citocinas que se encuentren en el ambiente circundante. Los TAMs adquieren un fenotipo M2 que favorece el crecimiento del tumor, y la polarización de este fenotipo se ve beneficiada por la secreción de las IL-1, IL-10 e IL-13 de las células inmunes (Carvalho Da Fonseca, 2013).

Por otro lado, se tiene bien reportado que los DLEs por si solos son capaces de estimular la secreción de la IL-8, la cual, como se mencionó anteriormente, es importante para la progresión de gliomas (Ojeda et al. 2005 y Franco-Molina, 2007).

Con lo anterior, se puede pensar que en el caso particular de los glioblastomas, los DLEs promueven un ambiente en donde se favorece la secreción de ciertas citocinas (principalmente IL-10 e IL-8) secretadas por las células del sistema inmune y por las propias células tumorales, permitiendo así un ambiente que favorezca a las células tumorales a evadir al sistema inmune y por consiguiente, el desarrollo del tumor.

## 11. CONCLUSIONES

El FT favorece la viabilidad *in vitro* de la línea celular U87-GFP, así como el aumento del tamaño del tumor cuando las células son implantadas en la corteza prefrontal cerebral de la rata.

## 12. REFERENCIAS

- Arko, L., Katsyv I., Park, G. E., Luan, W. P. & and Park, J. K. (2010). Experimental approaches for the treatment of malignant gliomas. *Pharmacology & Therapeutics*; 128 (1): 1–36.
- Arnaudov, A. & Kostova, Z. (2015). Dialysable leukocyte extracts in immunotherapy. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*; 29 (6): 1017-1023.
- Baram, P., Yuan, L. & Mosko, M. M. (1966). Studies on the transfer of human delayed-type hypersensitivity I. Partial purification and characterization of two active components. *The Journal of Immunology*; 97 (3): 407-420.
- Bernal-Pérez, K.L. (2010) Tesis: Factor de Transferencia, Facultad de Química, UNAM.
- Bondy, M. L., Scheurer, M. E., Malmer, B., Barnholtz-Sloan, J. S. & Davis, F. G. (2008). Brain tumor epidemiology: Consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Cancer*, 113 (7): 1953–1968.
- Borkowsky, W., Suleski, P., Bhardwaj, N. & Lawrence, H. S. (1981). Antigen-specific activity of murine leukocyte dialysates containing transfer factor on human leukocytes in the leukocyte migration inhibition (LMI) assay. *The Journal of Immunology*; 126 (1): 80-82.
- Borvak, J., Mayer, V. & Moravek, L. (1990). Amino acid analysis of selected reversed-phase high performance liquid chromatographic peaks of crude and partially purified lysed human leukocyte ultrafiltrate. *Acta virologica*; 34 (1): 11-18.
- Brat, D. J., Bellail, A. C. & Van Meir, E. G. (2005). The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro-oncology*; 7 (2): 122-133.

- Burger, D. R., Vandebark, A. A., Dunnick, W., Kraybill, W., Daves, G. D. & Vetto, R. M. (1979). Human transfer factor: structural properties suggested by HPRP chromatography and enzymatic sensitivities. *The Journal of Immunology*; 122 (3): 1091-1098.
- Byston, J., Cech, K., Pekarek, J. & Jilkova, J. (1996). Effect of anti-herpes specific transfer factor. *Biotherapy*; 9 (1-3): 73-75.
- Carvalho da Fonseca, A. C. & Badie, B. (2013). Microglia and macrophages in malignant gliomas: recent discoveries and implications for promising therapies. *Clinical and Developmental Immunology*; 2013: 264124.
- Chesler, D.A., Berger, M.S. & Quinones-Hinojosa, A. (2012). The potential origin of glioblastoma initiating cells. *Front Biosci (Schol Ed)*. 4, 190-205.
- Eckert, A., Kloor, M., Giersch, A., Ahmadi, R., Herold-Mende, C., Hampl, J. A. & Wiestler, O. D. (2007). Microsatellite Instability in Pediatric and Adult High-grade Gliomas. *Brain pathology*; 17 (2):146-150.
- Estrada-Parra, S., Nagaya, A., Serrano, E., Rodríguez, O., Santamaría, V., Ondarza, R. & Calva, C. (1998). Comparative study of transfer factor and acyclovir in the treatment of herpes zoster. *International journal of immunopharmacology*; 20 (10): 521-535.
- Fabre, R. A., Pérez, T. M., Aguilar, L. D., Rangel, M. J., Estrada G. I., Hernández P.R. & Estrada P.S. (2004). Transfer factors as immunotherapy and supplement of chemotherapy in experimental pulmonary tuberculosis. *Clinical & Experimental Immunology*; 136 (2): 215-223.
- Flores, S. G., Gómez, V. J., Orea, S. M., López, T. J., Serrano, E., Rodriguez, A. & Jiménez, S. N. (2004). Transfer factor as specific immunomodulator in the treatment of moderate-severe atopic dermatitis. *Revista alergia Mexico (Tecamachalco, Puebla, Mexico: 1993)*; 52 (6); 215-220.

- Franco-Molina, M. A, Mendoza-Gamboa, E., Castillo-León, L., Tamez-Guerra, R.S. & Rodríguez-Padilla, C. (2005). Bovine Dialyzable Leukocyte Extract Modulates the Nitric Oxide and ProInflammatory Cytokine Production in Lipopolysaccharide-Stimulated Murine Peritoneal Macrophages In Vitro *J Med Food*; 8 (1): 2005, 20–26.
- Franco-Molina, M. A., Mendoza-Gamboa, E., Castillo-Tello, P., Isaza-Brando, C. E., Vera García, M. E., Castillo-León, L. & Rodríguez-Padilla, C. (2007). Bovine dialyzable leukocyte extract modulates cytokines and nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated human blood cells. *Cytotherapy*; 9 (4): 379-385.
- Pizza, G., da Vinci C. & Viza D. (2002). Immunotherapeutic approaches for renal cancer, *Folia Biol. (Praha)*; 48 (5): 167–181.
- Gerber, H. P. & Ferrara, N. (2005). Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer research*; 65 (3): 671-680.
- González, M., Ordóñez, A., Feliu J., Zamora P. & Espinosa E. (2007). Segunda edición. Tratado de Medicina Paliativa y tratamiento de soporte del paciente con cáncer. Madrid. Médica Panamericana; 2: 101.
- Gordon, M. S. & Cunningham, D. (2005). Managing patients treated with bevacizumab combination therapy. *Oncology*; 69 (Suppl. 3): 25-33.
- Gottlieb, A. A., Maziarz, G. A., Tamaki, N. & Sutcliffe, S. B. (1980). The effects of dialyzable products from human leukocyte extracts on cutaneous delayed-hypersensitivity response. *The Journal of Immunology*; 124 (2): 885-892.
- Greenberg H.S, Chandler W.F & Sandler H.M. (1999). First edition, Brain Tumors. Contemporary Neurology Series. USA; 1:16-173.

- Hambardzumyan, D., Gutmann, D. H. & Kettenmann, H. (2016). The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nature neuroscience*; 19 (1): 20-27.
- Hernández Esquivel, M.A. (2015) Tesis: “Efecto antimetastásico de Transferon® en un modelo murino de cáncer de próstata”, Escuela Nacional de Ciencias biológicas, IPN.
- Hicklin, D. J. & Ellis, L. M. (2005). Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *Journal of clinical oncology*;23 (5): 1011-1027.
- Johnson, D. R. & O’Neill, B. P. (2012). Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era. *Journal of neuro-oncology*; 107 (2): 359-364.
- Karhumäki, E., Marnela, K. M. & Krohn, K. (1988). Chromatographic and enzymatic effects on transfer factor-like activity from human leukocytes and porcine spleen dialysate. *International Journal of Biochemistry*; 20 (10): 1067-1072.
- Khan A., Garrison O., Hill J.M., Antonetti A., Hill N.O. & Gracy R.W. (1980). Isolation and characterization of immunopeptide from dialyzable leukocyte extract. *Cell. Immunol*; 55 (2): 420–427.
- Kirkpatrick, C. H. & Gallin, J. I. (1974). Treatment of infectious and neoplastic diseases with transfer factor. *Oncology*; 29 (1): 46-73.
- Kirkpatrick, C. H. (2000). Transfer factors: identification of conserved sequences in transfer factor molecules. *Molecular Medicine*; 6 (4): 332.
- Lacroix, M., Abi-Said, D., Fourney, D. R., Gokaslan, Z. L., Shi, W., DeMonte, F. & Hess, K. (2001). A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma

multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *Journal of neurosurgery*; 95 (2): 190-198.

Lantos P.L., Louis D.N. & Rosenblum M.K. et al. (2002) Tumors of the Nervous System. Oxford University Press, London.

Lawrence, H. S. (1955). The transfer in humans of delayed skin sensitivity to streptococcal M substance and to tuberculin with disrupted leucocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 34 (2), 219.

Lawrence, H. S. & Borkowsky, W. (1981). Transfer factor: recent developments in the pursuit of an idea. *Cellular immunology*; 62 (2): 301.

Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger & P. C., Jovet, A. (2007). The 2007 WHO Classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica*; 114 (2): 97–109.

Masi, M., De Vinci, C. & Baricordi, O. R. (1996). Transfer factor in chronic mucocutaneous candidiasis. *Biotherapy*; 9 (1-3): 97-103.

Medina-Rivero, E., Merchand-Reyes, G., Pavón, L., Vázquez-Leyva, S., Pérez-Sánchez, G., Salinas-Jazmín, N. & Pérez-Tapia, S. M. (2014). Batch-to-batch reproducibility of Transferon™. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; 88: 289-294.

Melo G. G., González T.F., Castro N.C., Castro R.O., Olaya N., Penagos G.P. & Zubieta C. (2014). Multiform glioblastomas: current discussions on biomolecular markers as factors for prognosis regarding a series of cases with a survival rate over 2 years in the Instituto Nacional de Cancerología INC-Colombia. *Acta Neurol Colomb*; 30 (4): 282-289.

Mendoza-Gamboa, E., Franco-Molina, M. A., Zapata-Benavides, P., Castillo-Tello, P., Vera-Garcia, M. E., Tamez-Guerra, R. S. & Rodríguez-Padilla, C. (2008). Bovine dialyzable leukocyte extract modulates AP-1 DNA-binding activity

and nuclear transcription factor expression in MCF-7 breast cancer cells. *Cytotherapy*; 10 (2): 212-219.

Mocellin, S., Rossi, C. R., Lise, M. & Marincola, F. M. (2002). Adjuvant immunotherapy for solid tumors: from promise to clinical application. *Cancer Immunology, Immunotherapy*; 51 (11-12): 583-595.

Navarro, C. D., Serrano, M. E., Orea, M., Estrada, P. S., Terán, O. L., Gómez, V. J. & Flores, S. G. (1995). Transference factor in moderate and severe atopic dermatitis. *Revista alergía Mexico (Tecamachalco, Puebla, Mexico: 1993)*; 43 (5): 116-123.

Newlands, E. S., Blackledge, G. R., Slack, J. A., Rustin, G. J., Smith, D. B., Stuart, N. S. & Brampton, M. H. (1992). Phase I trial of temozolomide (CCRG 81045: M&B 39831: NSC 362856). *British journal of cancer*, 65 (2): 287.

Ohgaki, H. & Kleihues, P. (2005). Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta neuropathologica*; 109 (1): 93-108.

Ojeda, M. O., Fernández-Ortega, C. & Rosainz, M. D. J. A. (2000). Dialyzable leukocyte extract suppresses the activity of essential transcription factors for HIV-1 gene expression in unstimulated MT-4 cells. *Biochemical and biophysical research communications*; 273 (3): 1099-1103.

Osoba, D., Brada, M., Yung, W. K. A. & Prados, M. D. (2000). Health-related quality of life in patients with anaplastic astrocytoma during treatment with temozolomide. *European Journal of Cancer*; 36 (14): 1788-1795.

Packer R.J. & Frappaz, D. (2016). Pilocytic astrocytomas. *Handbook of Clinical Neurology*; 134 (2016): 329-344.

Paque, R. E., Kniskern, P. J., Dray, S. & Baram, P. (1969). In vitro studies with "transfer factor": Transfer of the cell-migration inhibition correlate of delayed hypersensitivity in humans with cell lysates from humans sensitized to

histoplasmin, coccidioidin, or PPD. *The Journal of Immunology*; 103 (5): 1014-1021.

Pineda, B., Estrada-Parra, S., Pedraza-Medina, B., Rodriguez-Ropon, A., Pérez, R. & Arrieta, O. (2005). Interstitial transfer factor as adjuvant immunotherapy for experimental glioma. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*; 24 (4): 575-583.

Prados, M. D., Berger, M. S. & Wilson, C. B. (1998). Primary central nervous system tumors: advances in knowledge and treatment. *CA: a Cancer Journal for clinicians*; 48 (6): 331-360.

Ray, S. K. (2010). Glioblastoma. Molecular Mechanisms of Pathogenesis and Current Therapeutic Strategies. *Springer Science & Business Media*.

Reagan-Shaw, S., Nihal, M. & Ahmad, N. (2008). Dose translation from animal to human studies revisited. *The FASEB Journal*, 22(3), 659-661.

Rozzo, S. J. & Kirkpatrick, C. H. (1992). Purification of transfer factors. *Molecular immunology*; 29 (2): 167-182.

Stupp, R., Dietrich, P. Y., Kraljevic, S. O., Pica, A., Maillard, I., Maeder, P. & Porchet, F. (2002). Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide. *Journal of Clinical Oncology*; 20 (5): 1375-1382.

Stupp, R., Mason, W. P., Van Den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. & Curschmann, J. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *New England Journal of Medicine*; 352 (10): 987-996.

- Tihan, T. & Bloomer, M. M. (2010). Astrocytic neoplasms of the central nervous system and orbit: a morphologic perspective. *Seminars in diagnostic pathology*; 27 (2): 114-121.
- Tonn, J. C., Westphal, M. & Rutka, J. T. (2010). Oncology of CNS tumors. Second edition. Springer Science & Business Media. Canada; 2: 14-15.
- Valdés A.F.S., Fernández C.B.O., Gómez A.H.E., Gillama E.N., Lastra G.A. & López P.S. (1991). Atopic dermatitis. Treatment with transfer factor. A controlled clinical trial. *Rev Alerg*; 38: 158–62.
- Vandenbark, A. A., Burger, D. R., Dreyer, D. L., Daves, G. D. & Vetto, R. M. (1977). Human transfer factor: fractionation by electrofocusing and high pressure, reverse phase chromatography. *The Journal of Immunology*; 118 (2): 636-641.
- Vecht C., Stupp, R., Reni, M., Gatta, G. & Mazza, E. (2007). Anaplastic astrocytoma in adults. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*; 63 (1): 72–80.
- Weller, M., van den Bent, M., Hopkins, K., Tonn, J. C., Stupp, R., Falini, A. & Chinot, O. (2014). EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. *The lancet oncology*; 15 (9): 395-403.
- Wesolowska, A., Kwiatkowska, A., Slomnicki, L., Dembinski, M., Master, A., Sliwa, M. & Kaminska, B. (2008). Microglia-derived TGF- $\beta$  as an important regulator of glioblastoma invasion—an inhibition of TGF- $\beta$ -dependent effects by shRNA against human TGF- $\beta$  type II receptor. *Oncogene*; 27 (7): 918-930.
- Wesolowski, J.R., Rajdev P. & Mukherji S.K. (2010). Temozolomide (Temodar). *J Neuroradiol*; 31: 1383– 84.

Yi Lou, Martin E. Dort (2001) *Delayed-Type Hipersensitivity*. Current Protocols in Immunology. Mayo 2001.

Zhang, J., Stevens M.F. & Bradshaw T.D. (2012). Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Current molecular pharmacology*; 5 (1): 102-114.