



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DEL TRANSFERON® SOBRE LA RESPUESTA
INMUNE DE RATAS CON GLIOBLASTOMA**

T E S I S

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

P R E S E N T A:

DENISSE ITZEL ARCOS MONTOYA



Ciudad de México,

2017





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	LIDIA SUMIKO MORIMOTO MARTINEZ
SECRETARIO	ALIESHA ARACELI GONZALEZ ARENAS
1ER. SUPLENTE	OLIVIA TANIA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ
2DO. SUPLENTE	EDITH ARACELI CABRERA MUÑOZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNAM
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA GENÓMICA Y TOXICOLOGÍA AMBIENTAL
LAB. C138 (NUEVA SEDE)

ASESORA DEL TEMA:

DRA. ALIESHA A. GONZÁLEZ ARENAS

SUSTENTANTE:

DENISSE ITZEL ARCOS MONTOYA



Índice

	Página
Lista de Figuras	I
Lista de Tablas	I
Abreviaturas	II
1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Antecedentes	3
3.1 Tumores Cerebrales	
3.1.1 Astrocitomas	
3.1.1.1 Astrocitoma Pilocítico (Grado I)	
3.1.1.2 Astrocitoma Subependimario de Células Gigantes (Grado I)	
3.1.1.3 Xantoastrocitoma Pleomórfico (Grado II)	
3.1.1.4 Astrocitoma Difuso (Grado II)	
3.1.1.5 Astrocitoma Anaplásico (Grado III)	
3.1.1.6 Glioblastoma (Grado IV)	
3.1.1.6.1 Epidemiología	
3.1.1.6.2 Histología e Inmunohistoquímica	
3.1.1.6.3 Clasificación molecular	
3.1.1.6.4 Diagnóstico	
3.1.1.6.5 Sintomatología	
3.1.1.6.6 Factores de riesgo	
3.1.1.6.7 Tratamiento Clásico	
3.2 Respuesta inmune en el desarrollo del tumor	
3.2.1 Interleucina 6 (IL-6)	
3.3 Inmunoterapia como alternativa terapéutica en glioblastoma	
3.4 Factor de Transferencia	
3.4.1 Transferon®	
3.4.1.1 Obtención	



3.4.2	Estructura química y componentes	
3.4.3	Actividad inmunológica	
3.4.4	Aplicaciones	
4.	Planteamiento del problema	30
5.	Hipótesis	30
6.	Objetivos	31
7.	Metodología	32
7.1	Obtención de células	
7.2	Ensayo <i>in vivo</i>	
7.2.1	Implante de células tumorales en la corteza prefrontal de rata	
7.2.2	Tratamiento con Transferon®	
7.2.3	Obtención de suero y cerebros	
7.2.3.1	Análisis de interleucinas en suero	
7.2.4	Inmunofluorescencias	
7.2.4.1	Determinación del área dañada y de la migración celular	
7.3	Ensayo <i>in vitro</i>	
7.3.1	Cuantificación de pJAK-1 y JAK-1	
7.3.1.1	Cultivo celular	
7.3.1.2	Western Blot	
8.	Resultados	37
8.1	Migración	
8.2	Área afectada	
8.3	Análisis de interleucinas en suero	
8.4	Determinación de pJAK-1 y JAK-1	
9.	Discusión	45



10. Conclusiones	51
11. Perspectivas	51
12. Referencias	52
13. Apéndice	61



Lista de Figuras

Figura		Página
1	Clasificación molecular de los GBM	8
2	Inmunoedición del cáncer	12
3	Microambiente tumoral	14
4	Interleucina 6	19
5	Transferon®	22
6	Implante estereotáxico de células U87 en la corteza prefrontal del cerebro de rata	33
7	Esquema de administración del Transferon®	34
8	Migración celular	38 - 40
9	Área afectada	41 - 43
10	Cuantificación de IL-6	44
11	Determinación de pJAK-1 y JAK-1	44
12	Expresión de IL-6 en macrófagos/microglia	49

Lista de Tablas

Tabla		Página
1	Factores asociados al desarrollo de astrocitomas	10
2	Mecanismos de evasión de la respuesta inmune	16-18
3	Aportaciones sobre la estructura del FT	23
4	Efecto del FT en la respuesta inmune	25-7
5	Aplicaciones del FT en la clínica	28
6	Grupos de estudio	34



Abreviaturas

A	Amperes
AIF1	<i>Allograft Inflammatory Factor-1</i>
BBB	<i>Blood-Brain Barrier</i>
bFGF	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
CCL2	<i>C-C Motif Chemokine Ligand 2</i>
CCL22	<i>C-C Motif Chemokine Ligand 22</i>
CCR4	<i>C-C Chemokine Receptor type 4</i>
CD27	<i>Cluster of Differentiation 27</i>
CD4+	<i>Cluster of cuadruple Differentiation</i>
CD44, CD45	<i>Cluster of Differentiation 44, 45</i>
CD70	<i>Cluster of Differentiation 70</i>
CDKN2A, CDKN2B	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A and 2B</i>
CG	Cánula Guía
CHI3L1	<i>Chitinase-3-like protein 1</i>
CICUAL	Comité Interno para el Cuidado de los Animales de Laboratorio
CM	Cánula de Microinyección
CNS	<i>Central Nervous System</i>
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
CSF	<i>Colony-stimulating factor</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
DAPI	<i>(4',6-diamidino-2-phenylindole)</i>
DC	<i>Dendritic Cells</i>
DLE	<i>Dializable Leucocyte Extract</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DTH	<i>Delayed-type Hipersensitivity</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>

EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ENCB	<i>Escuela Nacional de Ciencias Biológicas</i>
FasL/CD95L	<i>Fas Ligand</i>
FoxP3	<i>Forkhead box P3</i>
FT	<i>Factor de Transferencia</i>
GBM	<i>Glioblastoma Multiforme</i>
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GITR	<i>Glucocorticoid- induced TNFR-related protein</i>
GLTSCR1 y 2	<i>Glioma Tumor Suppressor Candidate Region 1 and 2</i>
gp130	<i>Glycoprotein 130</i>
HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
HIF-1α	<i>Hypoxia Inducible Factor 1 alpha</i>
HPLC	<i>High-performance Liquid Chromatography</i>
IBA-1	<i>Ionized calcium-binding adaptor molecule 1</i>
IDH1	<i>Isocitrate Dehydrogenase 1</i>
IFN-1β	<i>Interferon 1 beta</i>
IgE	<i>Immunoglobulin E</i>
IL-1	<i>Interleukin-1</i>
IL-12Rβ1	<i>Interleukin-12 Receptor beta 1</i>
IL-13	<i>Interleukin-13</i>
IL-1β	<i>Interleukin-1 beta</i>
IL-2	<i>Interleukin-2</i>
IL-23	<i>Interleukin-23</i>
IL-2Rα/CD25	<i>Interleukin-2 Receptor alpha chain</i>
IL-4	<i>Interleukin-4</i>
IL-5	<i>Interleukin-5</i>

IL-6, IL-10	<i>Interleukin-6, 10</i>
IL-8	<i>Interleukin-8</i>
IL-9	<i>Interleukin-9</i>
INF-γ	<i>Interferon Gamma</i>
INK4A/ARF	<i>Inhibitors of Cyclin Dependent Kinase 4</i>
INNyN	<i>Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía</i>
IPN	<i>Instituto Politécnico Nacional</i>
JAK1, 2	<i>Janus Kinase 1, 2</i>
LOH 10q	<i>Loss of heterozygosity on cromosome 10q</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharides</i>
MDM2	<i>Murine Double Minute 2</i>
MDSC	<i>Myeloid-Derived Supressor Cell</i>
MET	<i>Hepatocyte growth factor receptor</i>
MGMT	<i>O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MMP-2, MMP-9	<i>Matrix Metalloproteinase-2 and 9</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MTS	<i>2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida</i>
NF1	<i>Neurofibromatosis type 1</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor Kappa Beta</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	<i>Nitric Oxide</i>
OLIG2	<i>Oligodendrocyte Linage Transcription Factor 2</i>
PD-1	<i>Programmed Death Receptor</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PDGFRA	<i>Platelet Derived Growth Factor Receptor A</i>
PD-L1	<i>Programmed Death Ligand 1</i>

PGE2	<i>Prostaglandin E2</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide-3 Kinase</i>
PIK3CA	<i>Phosphoinositide-3 Kinase, Catalitic, Alpha Polypeptide</i>
pJAK1	<i>Janus Kinase 1 phosphorylated</i>
PKB/AKT	<i>Protein Kinase B</i>
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
RB1	<i>Retinoblastoma gene</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RTK	<i>Receptor Tyrosine Kinase</i>
S100B	<i>Calcium-binding protein B</i>
SFB	<i>Suero Fetal Bovino</i>
SHH	<i>Sonic Hedgedog</i>
sIL-6Rα	<i>Soluble Interleukin-6 Receptor alpha</i>
SSI	<i>Solución Salina Isotónica</i>
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
TAM	<i>Tumor-Associated Macrophage</i>
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
Th17	<i>T helper 17 cells</i>
TMZ	<i>Temozolamide</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
TP53/P53	<i>Tumor Protein 53</i>
V	<i>Voltios</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>





1. Resumen

Los gliomas son los tumores cerebrales primarios más comunes en la población mexicana. Representan el 33% del total de tumores diagnosticados en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNyN) (Wegman-Ostrosky, 2016). Los glioblastomas son el tipo más común de gliomas, presentan un promedio de supervivencia de tan solo 15 meses después del diagnóstico (Wegman-Ostrosky, 2016). El tratamiento más utilizado para este padecimiento es la adición de Temozolomida (TMZ) a la radioterapia, a pesar de ello, sólo se obtiene un aumento de 2 meses en la supervivencia del paciente (Rønning, 2012), por lo que se ha sugerido a la inmunoterapia como alternativa terapéutica (Dogan, 2009).

El Transferon® es un medicamento de origen biológico producido por la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) del Instituto Politécnico Nacional (IPN) (Berón-Pérez, 2007). Se sabe que es capaz de regular la respuesta inmune en patologías como el asma y las alergias (Krishnaveni, 2013), sin embargo, no se ha estudiado el efecto de este medicamento al ser utilizado como terapia para cáncer, específicamente en glioblastomas.

En nuestro grupo de trabajo, se demostró que la administración del Transferon® favoreció la viabilidad *in vitro* de la línea U87, derivada de un glioblastoma humano, y en el estudio *in vivo* se observó un incremento en el tamaño del tumor (Mireles, 2016). En el presente trabajo se analizó el efecto del Transferon® en ratas con xenotransplante de la línea celular U87; en donde se observó un aumento en la capacidad migratoria, así como en la densidad de células tumorales. De igual manera, aumentó la concentración de IL-6 en el suero de ratas tratadas con el factor de transferencia.

2. Introducción

Los gliomas son un tipo de tumores cerebrales derivados de células gliales o células madre cancerosas los cuales representan el 33% del total de los tumores del Sistema Nervioso Central (CNS: *Central Nervous System*) (Wegman-Ostrosky, 2016), apareciendo 6.4 casos por cada 100 mil personas al año, de los cuales el 60-70% son de tipo astrocitomas (Burnet, 2007). Los astrocitomas son gliomas originados a partir de células gliales denominadas astrocitos, progenitores gliales o células troncales cancerosas (Chesler, 2012). En 1993 la Organización Mundial de la Salud (WHO: *World Health Organization*) propuso la escala para su clasificación de acuerdo al grado de malignidad, siendo el Grado I el menos agresivo y el Grado IV o glioblastoma (GBM) el de mayor agresión (Fritz, 2013), presentando un promedio de supervivencia de 15 meses después del diagnóstico (Wegman-Ostrosky, 2016). Una de las razones por las que este tumor es particularmente difícil de tratar, es debido a la presencia de la barrera hematoencefálica (BBB: *Blood-Brain Barrier*) ya que limita significativamente la penetración de la mayoría de los agentes terapéuticos hacia el sitio del tumor (Muldoon, 2007) es por eso que la búsqueda de alternativas terapéuticas resulta imprescindible, siendo la inmunoterapia una opción como adyuvante en el tratamiento del cáncer (Dougan, 2009).

Uno de los inmunomoduladores más conocidos es el Transferon®, el cual es un medicamento de origen biológico producido por la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (ENCB/IPN) que se compone del extracto dializable de leucocitos (DLE: *Dializable Leucocyte Extract*) (Rozzo, 1992). En un modelo murino con implante de la línea celular C6 (células de glioblastoma derivadas de rata), se observó que el factor de transferencia porcino redujo el tamaño del tumor y aumentó la expresión de citocinas de tipo Th1 (Pineda, 2005), sin embargo, en este modelo no se consideró el microambiente a nivel neurológico, ya que el tumor fue implantado en el muslo murino. Dado lo anterior, es de suma importancia conocer el efecto que tiene el Transferon® considerando las condiciones reales del desarrollo tumoral.

3. Antecedentes

3.1 Tumores Cerebrales

Los tumores cerebrales son patologías generadas a partir de alteraciones moleculares en los procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular (Furnari, 2007). Presentan un índice de mortalidad y una tasa de recurrencia muy altos aún después del tratamiento (Xie, 2009). Se denominan tumores primarios a aquellos que tienen como origen el Sistema Nervioso Central (CNS: *Central Nervous System*) y tumores secundarios aquellos que se originan fuera y llegan a este gracias al proceso de migración (Furnari, 2007). La incidencia anual-global de los tumores primarios es de aproximadamente 3.7 por cada 100 mil hombres, mientras que en el caso de las mujeres, se estima alrededor de 2.6 por cada 100 mil (Bondy, 2008).

Los gliomas son neoplasias de tipo primario, se desarrollan en el cerebro o en la médula espinal a partir de células troncales o células gliales. Estos representan alrededor del 33% de los tumores cerebrales primarios (Agnihotri, 2012). Con base en sus características histológicas y moleculares, los gliomas pueden clasificarse en: astrocitomas, oligodendrogliomas y ependimomas (Burnet, 2007).

3.1.1 Astrocitomas

Los gliomas astrocíticos o astrocitomas son los tumores cerebrales primarios más comunes, representan el 76% de todos los gliomas (Agnihotri, 2012) y se localizan en cualquier parte del encéfalo, especialmente en la corteza cerebral, presentándose con mayor frecuencia en adultos entre los 40 y 60 años de edad, siendo más comunes en hombres que en mujeres (3:2) (Ohgaki, 2005). En 1993 la WHO (por sus siglas en inglés *World Health Organization*) propuso una escala de clasificación con base al grado de malignidad, siendo el Grado I el menos agresivo y el Grado IV o Glioblastoma el de mayor agresividad (Fritz, 2013).

3.1.1.1 Astrocitoma Pilocítico (Grado I)

Los astrocitomas pilocíticos representan aproximadamente del 5-6% de todos los gliomas, con una incidencia anual de 0.37 casos por cada 100 mil personas (CBTRUS, 2017). Se desarrolla principalmente en adultos jóvenes y niños. Este tipo de astrocitoma se presenta con bordes bien definidos, es de crecimiento lento y no infiltrante. Histopatológicamente se puede identificar mediante la tinción de hematoxilina-eosina ya que se presentan asociados a fibras de Rosenthal (haces eosinofílicos gruesos y alargados en forma de espiral) como consecuencia de la gliosis de larga evolución, se caracterizan por tener un patrón de tejido bifásico (agregados de astrocitos bipolares alargados) y laxo (astrocitos multipolares redondos en asociación con microquistes y gránulos eosinofílicos) (Louis, 2007).

3.1.1.2 Astrocitoma Subependimario de Células Gigantes (Grado I)

Este tipo de tumor es benigno y de crecimiento lento que por lo general surge en la pared de los ventrículos laterales, se compone por grandes astrocitos ganglioides (Louis, 2007). Ocurre en aproximadamente 1 de cada 5 mil – 10 mil nacimientos y su aparición es típica en la primera o segunda década de la vida (Karajannis, 2015). Es la neoplasia del CNS más frecuente en enfermos con esclerosis tuberosa (enfermedad de Bourneville). El patrón característico va desde células poligonales con citoplasma abundante y esmerilado, hasta células más pequeñas, elongadas con el seno de una matriz fibrilar variable. Hay considerable pleomorfismo nuclear y son frecuentes las células multinucleadas (Reyes, 2007).

3.1.1.3 Xantoastrocitoma Pleomórfico (Grado II)

Representa menos del 1% de todas las neoplasias astrocíticas. Este tipo de astrocitoma es de favorable prognosis, se encuentra típicamente en niños y adultos jóvenes, son localizados en las meninges. Las características histológicas incluyen; células pleomórficas y lipidizadas, expresión de proteína fibrilar ácida de la glia

(GFAP: *Glial Fibrillary Acidic Protein*) y en ocasiones rodeada de una red de reticulina, así como de cuerpos eosinófilos granulares (Louis, 2007).

3.1.1.4 Astrocitoma Difuso (Grado II)

Comprende del 10% al 15% de todos los tumores cerebrales astrocíticos con una incidencia aproximada de 1.4 casos por cada millón de personas al año. Regularmente afecta a los adultos jóvenes entre 30 y 40 años, presentando afección predominante en hombres. Está caracterizado por tener un alto grado de diferenciación celular y por ser de crecimiento lento. Tiene tendencia intrínseca a progresar a astrocitoma anaplásico e incluso llegar a glioblastoma (Louis, 2007).

3.1.1.5 Astrocitoma Anaplásico (Grado III)

También es denominado como “Astrocitoma maligno” o “Astrocitoma de alto grado”, presenta una incidencia anual de 0.5 a 0.7 por cada 100 mil personas (Stuup, 2007). Afecta principalmente a adultos entre los 45-69 años y se localiza en los hemisferios cerebrales pero tiende a infiltrarse en los alrededores sin la destrucción completa del tejido cerebral, lo que conduce a una ampliación de las estructuras invadidas. En este tipo de tumor, son poco comunes los quistes macroscópicos pero con frecuencia se presentan áreas de granularidad, opacidad y consistencia suave (Louis, 2007).

3.1.1.6 Glioblastoma (Grado IV)

3.1.1.6.1 Epidemiología

El glioblastoma o también denominado “Glioblastoma Multiforme” (GBM), es el tumor cerebral primario más frecuente, representa del 60-75% de los tumores astrocíticos con una incidencia de 3-4 casos nuevos por cada 100 mil personas al año (CBTRUS, 2017). El Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNyN) reporta que en México, el 9% de todos los tumores cerebrales son de tipo GBM, estos representan cerca del 45.7% de todos los gliomas (Magaña-Maldonado, 2016)

y presentan una incidencia de 3.5 por cada 100 mil habitantes (Wegman-Ostrosky, 2016). Afecta principalmente a adultos y es localizado en los hemisferios cerebrales (Louis, 2007). Es el tipo de tumor de mayor severidad, se puede manifestar a cualquier edad, sin embargo, se observa un pico de incidencia entre los 45 y 75 años (Ohgaki, 2004). En particular, en la población mexicana se presenta una media de diagnóstico de 45.7 ± 15.1 años (Wegman-Ostrosky, 2016). Más del 80% de los pacientes con glioblastoma son mayores de 50 años (Ohgaki, 2004). Se observa una media de sobrevivencia que va de los 12-15 meses después del diagnóstico (Bondy, 2008). Se encuentra con mayor frecuencia en hombres que en mujeres, con una prevalencia de 1.6 hombres por cada mujer (Louis, 2007). Es más común en caucásicos que en afro-americanos. Aproximadamente el 5% de los pacientes con gliomas malignos poseen una historia familiar con este padecimiento, algunos de estos, asociados con síndromes genéticos (Farrell, 2007).

Los sitios más afectados son los lóbulos; temporal (31%), parietal (24%), frontal (23%) y occipital (16%), mientras que el cerebelo y la medula espinal son sitios raros para esta neoplasia (Louis, 2007). En 2016, en México se reportó una prevalencia mayor en el lóbulo frontal (34%), lóbulo temporal (24%), lóbulo parietal (21%), lóbulo occipital (4%) y otras áreas como el tálamo y el cuerpo calloso (17%) (Wegman-Ostrosky, 2016). La infiltración más frecuente es hacia la corteza adyacente y a través del cuerpo calloso dentro del hemisferio contralateral lo que conlleva a una imagen bilateral o lesión simétrica (glioma mariposa) (Louis, 2007).

3.1.1.6.2 Histología e inmunohistoquímica

En el caso del GBM los tumores son muy grandes al momento de su aparición y pueden ocupar gran parte del lóbulo. La lesión suele ser unilateral pero aquellos que se presentan en tallo cerebral y cuerpo calloso pueden tener crecimiento simétrico bilateral. Macroscópicamente se observan poco delimitados, se producen masas tumorales de color grisáceo en la periferia pero color amarillento en el centro, haciendo notable la necrosis debido a la ruptura de la mielina, la necrosis central puede ocupar más del 80% de la masa total del tumor (Louis, 2007), además se han observado hemorragias intratumorales muy frecuentes (Tonn, 2006).

Histopatológicamente puede diferenciarse por la presencia de atipia nuclear, pleomorfismo celular, alta actividad mitótica, trombosis vascular, proliferación microvascular, necrosis (Louis, 2007) y la característica formación de pseudopalisadas; regiones hipóxicas con centros necróticos e hiper celularidad en la periferia, observable con tinción de hematoxilina-eosina (Wippold, 2007).

Los marcadores inmunohistoquímicos son muy importantes para la clasificación y el diagnóstico neuropatológico de los gliomas. La herramienta más utilizada en la clínica son los marcadores para GFAP, la cual se encuentra aumentada en plasma, sin embargo, no es un marcador confiable, ya que en algunos tumores la mayor población de células se encuentra desdiferenciada (Jung, 2007) y para OLIG2 (por sus siglas en inglés *Oligodendrocyte lineage transcription factor 2*) expresado de forma abundante en gliomas difusos y raramente expresado en otras patologías del CNS (Furnari, 2007). Los GBM también resultan positivos para las proteínas de tipo S100 (Tonn, 2006), las cuales se encuentran involucradas en el control del ciclo celular de células nerviosas, gliales y epiteliales (Camby, 2006).

Se ha reportado la existencia de tres variantes histológicas: gliosarcoma, GBM de células gigantes y GBM de células pequeñas, aunque la sobrevida de estas no varía con respecto al GBM típico (González, 2014).

3.1.1.6.3 Clasificación molecular

En los astrocitomas de grado IV o GBMs se han identificado diversas anomalías cromosómicas como son; la presencia de una o más copias del cromosoma 7, deleciones o traslocaciones del cromosoma 9 y pérdida del cromosoma 10. Se ha observado en menor grado deleciones de los cromosomas 1 y 7 así como pérdidas del 22 (Bigner, 1990).

Existen 4 subtipos de GBM de acuerdo con los marcadores moleculares que expresan, los cuales se resumen en la siguiente figura:

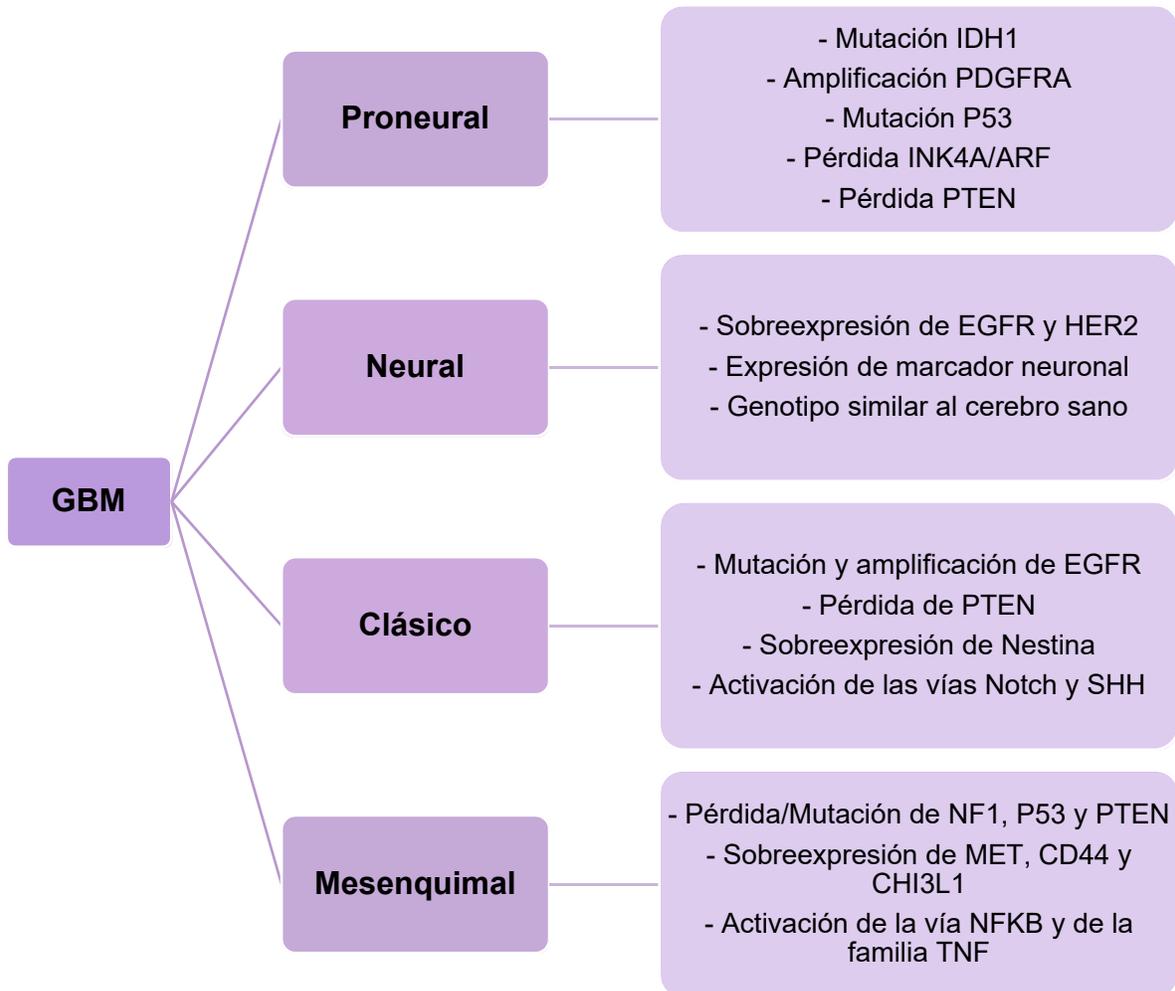


Figura 1. Clasificación molecular de los GBM.

Modificado de (Agnihotri, 2012).

3.1.1.6.4 Diagnóstico

La historia clínica para esta enfermedad es usualmente corta (menos de 3 meses), sin embargo, es fundamental para un diagnóstico certero (Louis, 2007). La evaluación radiológica puede aportar mucha información pero el diagnóstico diferencial definitivo debe ser obtenido a través de la integración clínica, radiológica e histopatológica ya que depende completamente de la histología del tejido (Tonn,

2006). La mayoría de los GBM se manifiestan rápidamente de *Novo*, con lesiones precursoras reconocibles (GBM primario) (Louis, 2007), sin embargo, pueden ser producto de la progresión de un tumor de menor severidad (GBM secundarios) (Schwartzbaum, 2006), los cuales son originados después de 5-10 años de diagnóstico de un astrocitoma de tipo II/III (Burnet, 2007).

3.1.1.6.5 Sintomatología

Puede ser dividida en dos categorías: no específica y específica. Los síntomas no específicos son dolor de cabeza, somnolencia, oscurecimientos visuales, rigidez de la nuca, náuseas, vómito y ocasionalmente parálisis del sexto par craneal, mientras que los síntomas específicos son dependientes de la localización del tumor e incluyen trastornos motores, sensoriales, visuales, del lenguaje e incluso se observan alteraciones en la marcha y en la audición (Tonn, 2006).

3.1.1.6.6 Factores de riesgo

En los astrocitomas humanos se han descrito una gran variedad de factores implicados en el desarrollo del mismo, estos se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Factores asociados al desarrollo de astrocitomas.

Tipo de factor	Factor relacionado	
Medio ambiente	Exposición a Radiación ionizante	
Alteraciones moleculares	Gen/Alteración	Función
	Mutación en IDH1	Metabolismo energético: producción de 2-hidroxi glutarato (oncometabolito)
	Mutación en PTEN	Regulador celular: proliferación, supervivencia, señalización
	Alteraciones en EGFR	
	PIK3CA	
	Deleción o mutación de NF1	
	LOH 10q	Asociado con supervivencia corta
	Pérdida RB1, 13q14 (retinoblastoma)	Regulador del ciclo celular
	Duplicación de MDM2	Regulador negativo de TP53
	Deleción homocigota de CDKN2A y CDKN2B	Supresores tumorales
	Mutación en TP53	
	Amplificación de RTK	Regula crecimiento, división celular, angiogénesis
	Alteración de PDGF	
	Aumento de MGMT	Reparación del DNA
Pérdida de 19q13	GLTSCR1 y 2	
Síndromes genéticos relacionados	Neurofibromatosis 1 y 2 Síndrome de Li-Fraumeni Síndrome de Turcot Hamartoma múltiple	
Factores inmunológicos relacionados	Alergias Varicela Altos niveles séricos de IgE	
Género	Relación 3:2 Hombres : Mujeres	

(González, 2014) (Pérez-Carro, 2014) (Bondy, 2008) (Furnari, 2007) (Tonn, 2006) (Schwartzbaum, 2006)

3.1.1.6.7 Tratamiento Clásico

Inicialmente se realiza una biopsia del tejido para el diagnóstico certero, seguido de la resección macroscópica, con lo que se obtiene una disminución de la carga tumoral. Sin embargo, debido a su naturaleza altamente difusa e infiltrante, los GBMs no pueden ser eliminados completamente con cirugía y no se observa una mejora significativa al ser tratados con radioterapia o quimioterapia (Lacroix, 2001). La adición de Temozolomida (TMZ) a la radioterapia en un diagnóstico temprano, ofrece un aumento en la supervivencia de 2 meses (Stupp, 2005). El estado de metilación de la enzima reparadora del DNA, MGMT (*O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase*), es considerado un predictor importante de la respuesta a la TMZ, siendo la hipermetilación un indicador favorable para el tratamiento con agentes alquilantes (como es la TMZ), esto debido a que la metilación de la enzima MGMT inhibe la reparación del DNA y por lo tanto se acentúa el efecto antitumoral de este tipo de fármacos (Loda, 2017).

3.2 Respuesta Inmune en el desarrollo del tumor

La Inmunoedición del cancer o también denominada las 3 E's del cáncer, es el proceso dinámico compuesto por 3 etapas: Eliminación, Equilibrio y Escape (Fig 2). En condiciones ideales, el crecimiento tumoral primario puede ser prevenido gracias a la eliminación, sin embargo, en la etapa de equilibrio y a causa de la interacción dinámica entre las células cancerosas y el sistema inmune, se producen nuevas poblaciones celulares con capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero, lo que conlleva a la tercera etapa, el escape (Dunn, 2004).

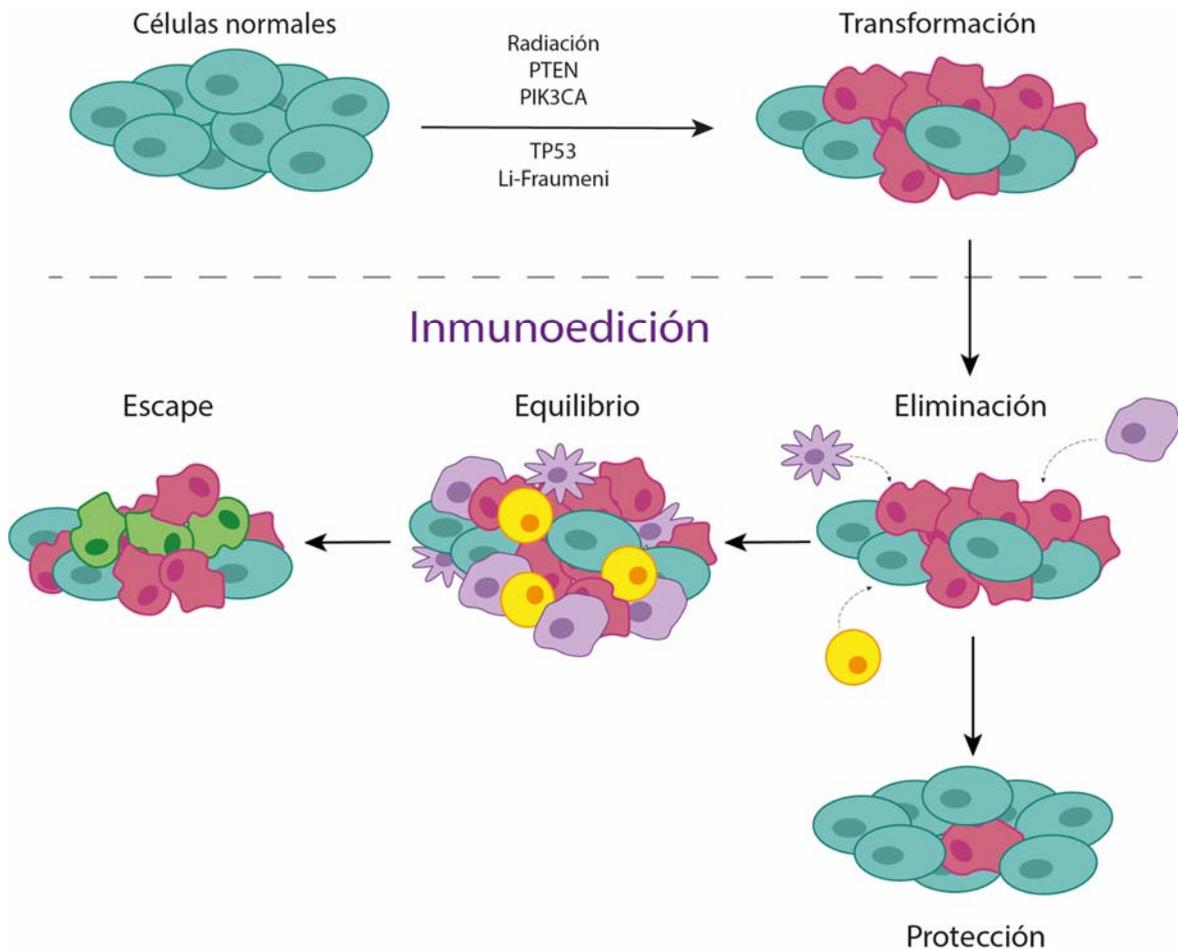


Figura 2. Inmunoedición del cáncer. Las células normales (azul) ante un estímulo como la radiación y la posterior alteración del DNA son transformadas en células cancerosas (rosa), estas células tienen la capacidad de secretar señales proinflamatorias (como la IL-6), que en la etapa de eliminación son detectadas por el sistema inmune provocando el reclutamiento de células de defensa como macrófagos (morado) y linfocitos T (amarillo), si la respuesta es temprana puede llegar a la erradicación completa del tumor (protección), sin embargo, en la mayoría de los casos progresa al equilibrio, en donde las células tumorales captan las señales del sistema inmune y mutan para convertirse en células cancerosas resistentes (verde) que poseen receptores de membrana de tipo PD-L1 que conllevan a la apoptosis de las células del sistema inmune y generan un microambiente inmunosuprimido para su desarrollo. Modificado de Dunn, 2004.

Inmunológicamente, los tumores de tipo GBM están caracterizados por la presencia de infiltrados celulares, como son; células dendríticas (DC: *Dendritic Cells*), macrófagos, microglia, células NK (por sus siglas en inglés *Natural Killer*) y

linfocitos T los cuales están asociados con la eliminación del tumor (Magaña-Maldonado, 2016).

La microglia actúa de forma similar a los macrófagos encontrados en otros tejidos: está encargada de remover el desecho celular de sitios dañados o células muertas naturalmente. Además, posee la capacidad de secretar moléculas de señalización, particularmente citocinas para mediar la inflamación local e influenciar la vida o muerte celular. Se ha observado que cuando existe daño cerebral la cantidad de microglia aumenta dramáticamente. Esta microglia se origina en dos fuentes diferentes; algunas proliferan de células residentes del cerebro y otras provienen de la migración hacia al área dañada (Purves, 2012). Sin embargo, estudios han revelado que la microglia posee un papel muy importante en el microambiente del GBM, promoviendo el desarrollo del tumor mediante la angiogénesis, tumorogénesis, la inmunosupresión local y por lo tanto beneficiando la proliferación celular debido a su asociación con células tumorales mediante diversas proteínas de membrana (Fig. 3), además es capaz de secretar moléculas inmunosupresoras como son la IL-10, el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β : *Transforming Growth Factor beta*) e inhibir la activación de linfocitos T (Carvalho da Fonseca, 2013).

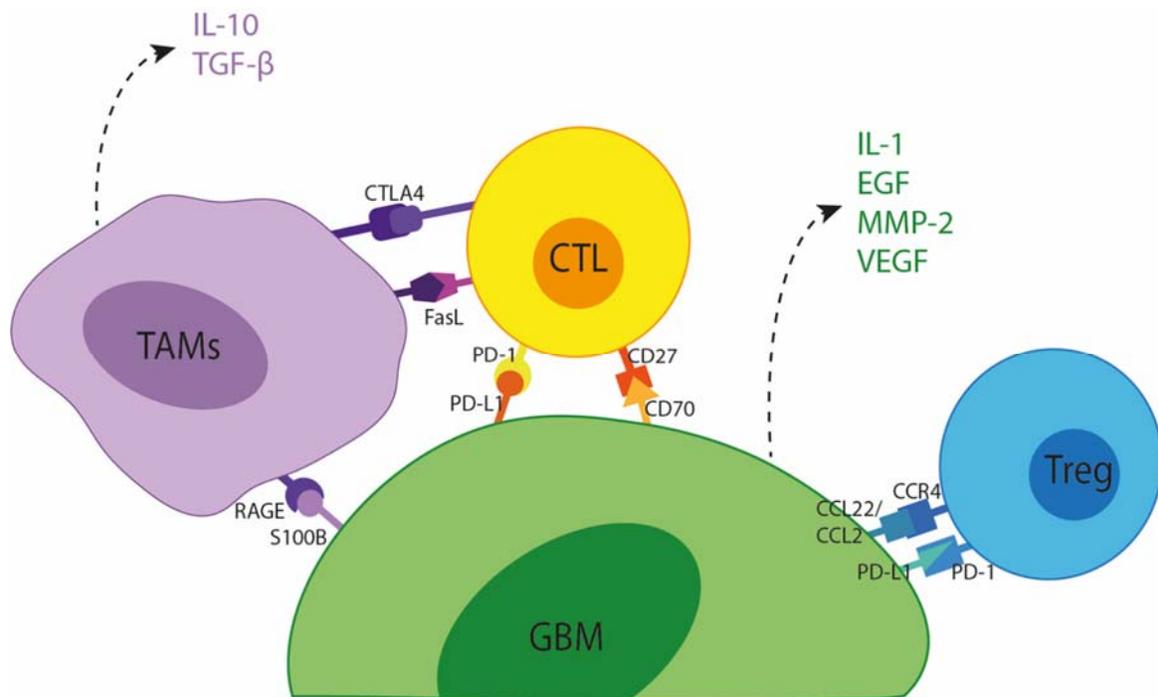


Figura 3. Microambiente tumoral. Se muestra la asociación de las células tumorales (GBM) con linfocitos T citotóxicos (CTL), linfocitos T reguladores (Treg) y con macrófagos (TAMs) mediante la interacción de diversos receptores membranales como son S100B, PD-L1, CD70 que aportan mejoras al microambiente del tumor y apoptosis a las células de defensa. Modificado de Razavi, 2006.

Las células tumorales asociadas a microglia (o asociadas a macrófagos) (TAMs), comprenden aproximadamente el 12% de la masa tumoral (Mangani, 2017), estas células son reclutadas activamente mediante la secreción de una gran variedad de factores, incluyendo quimiocinas, citocinas y proteínas de matriz (Carvalho da Fonseca, 2013). Se pueden diferenciar gracias a la expresión del factor CD45 que se encuentra en menor cantidad en microglia que en macrófagos. Sin embargo, esta clasificación no es tan certera ya que se sabe que la microglia es capaz de aumentar la expresión de CD45 en condiciones inflamatorias (Wainwright, 2011). En general existen dos fenotipos de macrófagos y microglia;

- **M1:** Células activadas clásicamente, poseen actividad contra células tumorales y secretan citocinas pro-inflamatorias.
- **M2:** Son activadas por métodos alternativos, disminuyen la intensidad de la activación inmune.

En el glioblastoma, la mayor población de macrófagos posee fenotipo M2 y secretan TGF- β , factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*), factor de crecimiento epidermial (EGF: *Epidermal Growth Factor*), metaloproteasas de matriz 2 y 9 (MMP-2, MMP-9: *Matrix metalloproteinase-2 and 9*) (Mangani, 2017), la presencia de células con este fenotipo está directamente relacionado con el grado del tumor y con el tiempo de supervivencia del paciente (Magaña-Maldonado, 2016).

Las células T reguladoras (Treg) representan del 5-10% de todos los linfocitos CD4+ circulantes; una de sus funciones es el mantenimiento de la tolerancia a antígenos propios. Algunas de sus características son la expresión constitutiva de: FoxP3 (por sus siglas en inglés *Forkhead box P3*), de la cadena alfa del receptor a interleucina 2 (IL-2R α : *Interleukin-2 Receptor alpha chain*, también denominado CD25), CTLA-4 (por sus siglas en inglés *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*) y GITR (por sus siglas en inglés *Glucocorticoid-induced TNFR-related protein*). Se dividen en dos grandes grupos dependiendo de su origen; Treg naturales (nTreg) se originan en el timo, mientras que las Treg inducidas (iTreg) surgen de la inducción de FoxP3 en células expuestas al microambiente (Mangani, 2017). Se ha observado en pacientes con glioma, un aumento en la cantidad de Treg en sangre y en el sitio del tumor, por lo que se ha sugerido como un indicador de pronóstico negativo (Heimberger, 2008). En modelos experimentales se ha observado que la mayoría son de tipo nTreg, sugiriendo que el glioma tiene la capacidad de reclutar células T reguladoras al sitio del tumor, esto mediado por el eje de quimiocinas/quimiorreceptores C-C (ligandos CCL22 y CCR4) (Wainwright, 2011).

En tumores cancerosos el sistema inmune y las células tumorales se encuentran en estado de equilibrio dinámico, esto mediante la modificación del microambiente por medio de la expresión o supresión de diversas citocinas fundamentales para la evasión del mismo (Nouroz, 2016). A continuación, en la Tabla 2, se nombran algunos mecanismos de inmunoevasión utilizados por el GBM:

Tabla 2. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune.

Origen	Molécula/ Mecanismo	Localización	Efecto
Sistema Nervioso Central	BBB	CNS	Previene la entrada de las células inmunes.
	Sistema Glinfático	CNS	Transporta células inmunes y macromoléculas.
	FasL/CD95L	Astroцитos	Induce la apoptosis de células T.
Microambiente	IL-6	Microglia/ TAMs	Suprime las células efectoras.
	IL-10		Promueve el crecimiento del tumor, inhibe la producción de INF- γ y TNF- α , disminuye la expresión del MHC clase II en monocitos, induce la anergia.
	TGF- β		Bloquea la activación y proliferación de células T, inhibe la producción de IL-2, suprime la actividad de las NK, promueve la actividad Treg, el crecimiento e invasión del tumor, polariza a M2.
	PGE2		Modifica el fenotipo de DCs en reguladoras.
	IL-1		Promueve la tumorigénesis.
	bFGF		
	CD70	Células GBM	Regula la apoptosis de las células T a través de su interacción con CD27.

Microambiente	Gangliósidos	Células GBM	Inducen la apoptosis de células T.
	FasL	Microglia/ TAMs	Induce la apoptosis de células T citotóxicas.
	Hipoxia	Vascularización inapropiada Consumo de oxígeno por las células del GBM	Activación de Treg a través de STAT3.
Células T reguladoras	CCL22	Células del GBM	Atracción de Tregs al sitio del tumor uniéndose a CCR4.
	CCL2		
Células supresoras de origen mieloide (MDSC)	NO	Células mieloides inmaduras reclutadas de la médula ósea	Inhibición de linfocitos Tc
	HIF-alfa		Induce afluencia de MDSC, angiogénesis e invasión Sobre expresión de PD-L1
Macrófagos asociados a tumor	CSF-1	Microglia/ TAMs	Polarizan a las TAMs a fenotipo M2.
	TGF- β 1		
	MIC-1		
	IL-10		
	S100B	Células del GBM	Inhíbe la producción de citocinas proinflamatorias por TAMs a través de la vía STAT3.
	Arginasa I		Induce la producción de PD-L1 en monocitos.
	RTF		Protección de la muerte celular.

	EGF	Microglia/ TAMs	Promueve la invasión y migración del tumor
	IL-6		
	MMPs		
	VEGF		Promueve el crecimiento y vascularización de la masa tumoral, induce la expresión de PD-1.

Modificado de (Razavi, 2016), (Mangani, 2017).

Las células de tipo Th1, Th2 y Th17 poseen funciones supresoras entre sí, se conocen como antagónicas (Serrano, 2009). Las células de tipo Th1 producen citocinas proinflamatorias (como es el IFN- γ) y son capaces de mediar la inmunidad celular. Las células Th2, en contraste, son de tipo efectoras y producen citocinas (IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, entre otras) las cuales regulan la proliferación de células B y guían la respuesta inmune humoral (Dong, 2001). Los linfocitos T helper 17 (Th17), secretores de IL-17, son capaces de inducir un efecto proinflamatorio. La actividad de estos linfocitos se encuentra mediada por interleucinas como la IL-6, IL-23 y el TGF- β (Serrano, 2009).

Se ha observado en gliomas que la presencia de células mieloides en el microambiente tumoral se ve influenciada por citocinas promotoras de células Th17 (TGF- β , IL-6, IL-1 β e IL-23) (Paladugu, 2012). El TGF- β ha sido sugerido como el factor principal de inmunosupresión ya que posee un efecto negativo en la proliferación y diferenciación de las células B (Lippitz, 2013) y de los linfocitos en Th17. Una vez diferenciados, la IL-23 induce la proliferación de estas (Serrano, 2009).

Albulescu y colaboradores en el año 2013, analizando suero de pacientes con glioblastoma de edades entre 58 y 62 años, encontraron una alta expresión de citocinas como son IL-6, IL-1 β , TNF- α e IL-10, lo que puede correlacionarse con el aumento de metástasis, angiogenesis e invasión de las células tumorales.

3.2.1 Interleucina 6 (IL-6)

La IL-6 o también denominada IFN- β 2 (Akdis, 2011), (Fig. 4) es una potente citocina inflamatoria que se encarga de mediar múltiples funciones como; la diferenciación y desarrollo de linfocitos B, la proliferación, supervivencia celular y el aumento de las señales apoptóticas (Kamimura, 2003). Además posee efectos sobre la formación de huesos, en las funciones endócrinas y puede afectar diferentes células o tejidos (Wolvekamp, 1990). Es secretada por neuronas, microglia, astrocitos y monocitos periféricos (Zhu, 2012). Muchos tipos de células pueden responder a la IL-6, incluyendo los astrocitos, células estromales endometriales, corazón, macrófagos, monocitos, microglia, células de kupffer, osteoblastoma, mieloma múltiple, células endoteliales, hepatocitos, entre otras (Suganuma, 2002). La IL-6 es conocida por actuar como factor de diferenciación para los Th17, así como ser secretada por los mismos (Serrano, 2009). Es un factor mitogénico para los astrocitos y junto con su receptor soluble (sIL-6R α) induce la gliosis de forma masiva (Weissenberg, 2004).

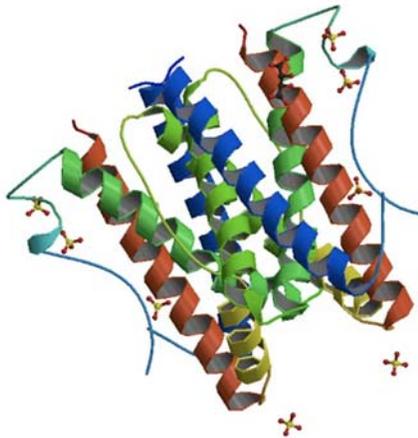


Figura 4. Interleucina 6. Se observa la proteína cristalizada, ID: 1ALU (Protein Data Bank, 2017).

IL-6 posee una estructura de tipo hélix-bundle que consiste en 4 α -hélices largas (Akdis, 2011). En condiciones fisiológicas, la IL-6 se encuentra presente en el cerebro en baja concentración. Sin embargo, se ha observado un aumento en la expresión y secreción durante enfermedades neurológicas, incluyendo; Alzheimer,

Parkinson, cáncer encefálico, esclerosis múltiple e isquemia cerebral (Rothaug, 2016).

La señalización de la IL-6 se da a través de un complejo localizado en la superficie de la célula, el cual está compuesto por el receptor IL-6R y el componente inductor de señal gp130 (Akdis, 2011). La IL-6 puede estimular una respuesta en un blanco celular de dos maneras diferentes:

1. *Señalización clásica*: Involucra la unión de la IL-6 con el receptor membranal IL-6R. El complejo IL-6/IL6R puede entonces unir en *cis* a la glicoproteína transductora de señal 130 (gp130), la cual es expresada de manera ubicua en la mayoría de las células (Fisher, 2014). Esta vía de señalización está asociada con un efecto anti-inflamatorio (Rothaug, 2016).
2. *Trans-señalización*: Alternativamente existe una forma soluble del receptor (sIL-6R) la cual puede formar un complejo con IL-6 y estimular células distantes que expresan gp130, pero no aquellas que expresen IL-6R (Rothaug, 2016).

La unión de la IL-6 con su receptor en ambas vías de señalización, convergen en una vía en común, la activación de JAK, con la subsecuente fosforilación de STAT3 y PI3K. Estas moléculas funcionan como factores de transcripción o reguladores enzimáticos que contribuyen a las actividades multifacéticas de la IL-6, incluyendo la progresión tumoral (Fisher, 2014).

Se ha observado que en pacientes con mieloma múltiple, se encuentran elevados los niveles de IL-6 en suero, lo cual es correlacionado con un pronóstico desfavorable, con lo que se observa que una reducción parcial de los niveles de IL-6 pueden restaurar la sensibilidad a los agentes quimioterapéuticos (Salem, 2000).

Esta citocina es secretada por células de GBM y producida a nivel de CNS por astrocitos. Es capaz de promover la invasión en líneas celulares de GBM como U87 pero no de otras como son la U343 (Li, 2010).

3.3 Inmunoterapia como alternativa terapéutica del glioblastoma

Actualmente, la mayoría de las estrategias terapéuticas que emplean al sistema inmune como blanco, se basan en la consideración de que las células T pueden reconocer y responder contra alteraciones genéticas y celulares que se producen durante el desarrollo y la progresión del cáncer (Mangani, 2017), sin embargo, y debido a que el CNS se encuentra rodeado por barreras anatómicas (barrera hematoencefálica, meninges, líquido cefalorraquídeo), es complicado el diseño de fármacos específicos para este padecimiento.

3.4 Factor de Transferencia

En 1955 Lawrence y colaboradores observaron que el extracto de leucocitos proveniente de sangre periférica humana es capaz de transferir inmunidad celular a partir de donadores inmunes a receptores no inmunes. Al componente activo de estos extractos celulares se le llamó: “Factor de Transferencia (FT)” (LoBuglio, 1974).

3.4.1 Transferon®

El Transferon® (Fig. 5) es un medicamento de origen biológico producido por la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) del Instituto Politécnico Nacional (IPN). Consiste en el FT correspondiente a una bolsa de sangre para donación (500 mL), alrededor de 5×10^8 leucocitos (Berrón-Pérez, 2007). Actualmente se sabe que el Transferon® es un extracto dializable de leucocitos (DLE: *Dialyzable Leukocyte Extract*), el cual es una mezcla heterogénea de péptidos de bajo peso molecular (<10 kDa) proveniente de la hemólisis y posterior diálisis de sangre periférica humana proveniente de donadores sanos (Medina-Rivero, 2016). Físicamente es un líquido amarillento, translúcido con pH 6.5-7 (Krishnaveni, 2013), es termolábil pero es muy estable si se mantiene frío (-20 a -70 °C), en estas condiciones puede preservarse por años (Berrón-Pérez, 2007).

Este medicamento está disponible en diversas presentaciones (oral, inyectable y oral liofilizado), sin embargo, en este trabajo nos enfocamos en la presentación para administración oral el cual, actualmente se encuentra en trámite para la obtención del Registro ante la Secretaria de Salud (No. de trámite ante la COFEPRIS: 1733004A4I0001).



Figura 5. Transferon®.

3.4.2 Obtención

El material biológico utilizado para la elaboración del Transferon® es obtenido de diversos bancos de sangre certificados de la Ciudad de México. Los paquetes celulares obtenidos son sometidos a pruebas biológicas descritas en la NOM-003-SSA2-1993. Mientras que su fabricación es sometida a la NOM-059-SSA1-2006 ya que es un hemoderivado. El procedimiento de obtención es una modificación al descrito por Lawrence en 1981 para la obtención de DLEs. Se parte de una poza de leucocitos lisados obtenidos a partir de donadores sanos. Una vez lisadas, estas células, pasan por un proceso de diálisis en el cual se emplea una membrana con corte molecular de 10-12 kDa. Se concentran, formulan y filtran con ayuda de una membrana de 0.22 μm antes del envasado. El producto terminado es sometido a pruebas de calidad establecidas en la NOM-253-SSA1-2012 para la disposición de sangre humana y sus componentes para fines terapéuticos (Bernal, 2010).

3.4.2 Estructura química y componentes

Al inicio se creía que el DLE solo contenía una especie molecular, sin embargo, al ser analizado se encontró que contiene muchas especies químicas con actividad biológica (LoBuglio, 1974). Está compuesto por una población de péptidos con baja hidrofobicidad (Medina-Rivero, 2016). Desde 1955 con el descubrimiento de Lawrence, diversos grupos de investigadores se dieron a la tarea de encontrar las moléculas encargadas de transferir la respuesta celular.

De manera general se han dividido a los componentes de los DLEs en dos fracciones principales:

- a) *Fracción antígeno específica*: Corresponde a moléculas con peso molecular de 3.5 a 6 kDa. Esta fracción corresponde a la suma de las experiencias inmunes del individuo (Berrón-Pérez, 2007).
- b) *Fracción antígeno inespecífica*: Comprende a moléculas por debajo de 3.5 y por arriba de 6 kDa, en ella encontramos moléculas como prostaglandinas, nicotidamina, ácido ascórbico y algunos factores de diferenciación de linfocitos (Berrón-Pérez, 2007).

A continuación, en la Tabla 3 se muestra un resumen sobre los descubrimientos acerca de la estructura del FT.

Tabla 3. Aportaciones sobre la estructura del FT.

Año	Autor(es)	Aporte	Técnica utilizada
1975	Sandler et al.	Cuatro fracciones con ascorbato, serotonina y un elemento no identificado con actividad colinérgica.	Columnas de filtración en gel.
1976	Burger et al.	Cuatro fracciones: 1. Actividad mitogénica, 2. Capacidad de transferencia, 3. Nicotidamida, 4. Elemento inmunosupresor	Cromatografía de exclusión en Sephadex G-25
1979	Wilson y Funderberg	Dos fracciones: 1. < 5kDa: inhibía la migración de leucocitos dependiente de	Cromatografía de exclusión en

		antígeno, 2. 14-17kDa de naturaleza peptídica y ribonucleotídica	Sephadex G-25 y purificación por Bio-gel P-10
1985	Börkav y Mayer	Componentes activos sean moléculas de proteína unidos a moléculas parecidas al RNA	Lectura de absorbancia en UV.
1987	Sipka et al.	Tres fracciones de las cuales una poseía efecto estimulante en fagocitos de sangre humana total	Cromatografía de exclusión en Sephadex G-25
1989 y 1990	Bövark	Se detectó la presencia de lisina, glicina, serina y glutámico	HPLC en fase inversa y diversas técnicas químicas de extractos ultrafiltrados
2000	Kirkpatrick et al.	El contenido peptídico media la actividad biológica. Secuencia de péptidos aislados: AUGx CUUCUUUAUGCUCAAGAUCUU /GUUGAAGAUAAU	HPLC en fase reversa
2016	Medina-Rivero	Identificación de 17 aminoácidos proteinogénicos de los cuales el más abundante fue la glicina (18.30%) y el menos abundante la arginina (0.5%), esto fue observado de forma consistente en 10 lotes	Cromatografía de exclusión molecular y Cromatografía Líquida (SE-ULPC)

Modificado de Pérez-Tapia, 2007.

3.4.3 Actividad inmunológica

A partir de su descubrimiento, se han desarrollado diversos modelos para estudiar su efecto tanto *in vitro* como *in vivo* en diversas patologías. Sin embargo,

cabe señalar que el efecto depende completamente del origen del FT así como el tipo de modelo evaluado.

En la Tabla 4 se mencionan los estudios realizados hasta el momento:

Tabla 4. Efecto del FT en la respuesta inmune.

Año	Modelo estudiado	Efecto inmunológico	Autor(es)
1967	<i>In vitro</i> células humanas	Proliferación de linfocitos específicos para tuberculina	Fireman
1974	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i> en monos Rhesus	Actividad quimiotáctica para neutrófilos y monocitos	Gallin y Kirkpatrick
1975	<i>In vitro</i> , muestra de pacientes con sarcoma	Producción de células T citotóxicas específicas para células de sarcoma osteogénico	Levin et al.
1979	<i>In vitro</i> células humanas	Aumento en la capacidad de linfocitos en respuesta a mitógenos	Petersen y Kirkpatrick
1979	<i>In vitro</i> células humanas	Inhibición de la migración antígeno específica leucocitaria	Borkowsky y Lawrence
1984	<i>In vitro</i> células humanas	Inhibición de la migración de macrófagos producida por una molécula de < 3.5kDa	Farmer et al.
1987	<i>In vitro</i> macrófagos humanos	Inducción de la producción de IL-1 y la activación de macrófagos	Dorfling et al.
1995	<i>In vitro</i> células periféricas mononucleares humanas	Incremento de la hipersensibilidad tipo D y del receptor para IL-2 en células CD4+	Gottlieb et al.
1995	<i>In vitro</i> células de bazo de ratón	Secreción de IFN γ e IL-12 (específicas de antígeno)	Alvarez y Kirkpatrick
1995	<i>In vitro</i> células MT4	Inhibición de la producción de TNF en células activadas con LPS	Fernández-Ortega

1995	<i>In vivo</i> ratones sensibilizados con DLEs específicos	Producción de IFN γ ,	Kirkpatrick
1997	<i>In vitro</i> células de médula ósea de ratón	Incrementa la sensibilidad de células progenitoras hematopoyéticas	Vacek et al.
2000	<i>In vivo</i> modelo en ratón con DLE humano	Favorece la recuperación de la hematopoyesis después de la radiación.	Vacek et al.
2004	<i>In vivo</i> modelo murino de infección con <i>M. tuberculosis</i>	Incremento en la supervivencia, favorece un perfil de citocinas TH1	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 murino de shock endotóxico	DLEs bovinos suprimen IL-10 e IL-6 y disminuyen la expresión del mRNA de IL-1 β , TNF- α e IL-12 β	Franco-Molina
2005	<i>In vitro</i> , leucocitos y células endoteliales	Adición de DLEs a leucocitos estimulados con constituyentes de la pared bacteriana suprime la producción de TNF- α . Potencializan la producción de IL-6 e IL-8	Ojeda et al.
2005	<i>In vivo</i> modelo murino de glioma C6 con FT de cerdo	Administración intratumoral como adyuvante de carmustina. Disminución en el volumen tumoral en un 41% y aumento de CD4+, CD8+, NK, IL-6, IL-2 y TNF- α .	Pineda et al.

2005	<i>In vivo</i> , en macrófagos peritoneales murinos	Células estimuladas con DLEs bovinos; disminución de TFN- α e IL-6 y aumento de IL-10	Franco-Molina et al.
2007	<i>In vivo</i> , obtención de sangre humana completa	Disminución de la producción de óxido nítrico, producción de citocinas TFN- α , IL-6 e IL-10	Franco-Molina
2010	<i>In vivo</i> , modelo aviar	DLEs aviares inducen la expresión del mRNA de IFN- γ e IL-2 en pollos vacunados con influenza aviar	Cabos-Marín et al.

Modificado de Bernal-Pérez, 2010.

3.4.4 Aplicaciones

El FT ha sido ampliamente utilizado solo y en combinación con varios medicamentos para el tratamiento de diversas enfermedades producidas por virus, bacterias, parásitos y hongos (Berrón-Pérez, 2007), reportes indican que es efectivo en enfermedades autoinmunes, diabetes, autismo, infertilidad, psoriasis, rinitis pigmentosa, asma e incluso algunos tipos de cáncer (Krishnaveni, 2013), mientras que en muy pocos casos presenta un efecto contrario al esperado (Berrón-Pérez, 2007). Hasta la fecha no se han reportado efectos adversos graves. En un estudio clínico realizado a 3844 pacientes con diagnóstico de alergias, enfermedades infecciosas y autoinmunes los efectos adversos más comunes fueron; dolor de cabeza (15.7%) y rash cutáneo (11.4%), presentándose dentro de las 24 horas después de la administración (Homborg, 2015).

A continuación, en la Tabla 5 se mencionan algunas de las aplicaciones utilizadas en la clínica actualmente:

Tabla 5. Aplicaciones del FT en la clínica.

	ENFERMEDAD	Efecto	Ref.
Hipersensibilidad	Dermatitis atópica grave	Aumento de linfocitos B, T. Disminución de células NK.	Rodríguez, 2002.
	Síndrome de Hiper IgE	Disminución de las lesiones escamosas, desaparición del ardor. Aumento del TGF-β.	Guardia-Peña, 2012.
Enfermedades Infecciosas	Hongos Candidiasis mucocutánea crónica	(Tratamiento con FT específico): aumento en la reactividad contra el antígeno candida.	Masi, 1996.
	Virus Varicela	Aumento de IFNγ y de CD4+.	Steele, 1980.
	Bacterias Tuberculosis pulmonar avanzada	Mejora de los pacientes debido al aumento de linfocitos T y B.	Estrada-Parra, 1983.

Anteriormente, en nuestro grupo de trabajo se realizó un ensayo *in vitro* para conocer el efecto del Transferon® en la viabilidad de la línea celular U87 derivada de un glioblastoma, mediante la reducción de una sal de tetrazolio (MTS: (2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida)), en el cual se observó que al añadir el Transferon® en concentraciones desde 1 pg/mL hasta 100 pg/mL, aumentó la cantidad de células a las 72 y 96 horas. En lo que respecta al ensayo *in vivo*, se realizó el implante de la misma línea celular en ratas macho de la cepa Wistar y se dejó crecer durante 4 semanas, posteriormente se administró el Transferon® durante 3.5 semanas y se observó un aumento en la migración y el tamaño tumoral (Mireles, 2016).

4. Planteamiento del problema

El uso del factor de transferencia es cada vez más común en la población mexicana, sin embargo, no se cuenta con evidencia suficiente para sustentar su uso como adyuvante en diversos tipos de cáncer, en especial del glioblastoma. En la actualidad este tipo de cáncer está caracterizado por su baja sobrevida y la falta de terapias efectivas.

El Transferon® es el primer factor de transferencia considerado como medicamento biológico. Actualmente se encuentra en trámite ante la COFEPRIS la obtención del registro sanitario para la presentación oral, por lo anterior es de suma importancia ampliar los conocimientos acerca de los efectos del Transferon®.

5. Hipótesis

Si el Transferon® induce el crecimiento tumoral de un xenotransplante de células de GBM en un modelo murino entonces, se modificará la respuesta inmune.

6. Objetivos

6.1 Objetivo General

Estudiar el efecto del Transferon® sobre la respuesta inmune en ratas con xenotrasplante de células derivadas de un glioblastoma humano en la corteza prefrontal.

6.2 Objetivos Particulares

- Determinar el efecto del Transferon® sobre el crecimiento y migración tumoral de la línea celular U87 mediante la técnica de inmunofluorescencia.
- Detectar y cuantificar los niveles de IL-6 en el suero de ratas con xenotrasplante tratadas con Transferon® mediante la técnica de ELISA.
- Cuantificar la cantidad de proteína pJAK1 para conocer la vía de señalización implicada en el aumento de la IL-6.

7. Metodología

7.1 Obtención de células

Se cultivó la línea celular U87, proveniente del glioblastoma de un hombre de 44 años. Fue transfectada con el transgen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP: *Green Fluorescent Protein*), por lo que se le denomina U87-GFP. Se cultivaron en DMEM (por sus siglas en inglés: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) con rojo fenol suplementado con suero fetal bovino (SFB) a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% y con humedad del 95%. El medio fue cambiado cada 48 horas hasta obtener una confluencia celular del 70–80%. Las células fueron contadas mediante una cámara de Neubauer.

7.2 Ensayo *in vivo*

Animales. Para este estudio fueron utilizadas 16 ratas macho adultas de la cepa Wistar (220-250 g) las cuales se encontraban hospedadas en el bioterio del INNyN (Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía), en un cuarto con temperatura controlada (22-24°C) y ciclo de luz-oscuridad de 12:12 h con agua y alimento *ad libitum*. Todos los animales fueron tratados de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999 y al reglamento interno del CICUAL (Comité Interno para el Cuidado de los Animales de Laboratorio) del INNyN “Manuel Velasco Suárez” para evitar o disminuir el sufrimiento de los animales.

7.2.1 Implante de células tumorales en la corteza prefrontal de rata

Las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina/xilasina (80 y 10 mg/Kg respectivamente, vía intraperitoneal). Se colocaron en el aparato estereotáxico y se les implantaron 200 mil células U87-GFP en DMEM en un volumen de 2 µL en la corteza motora de la rata, con coordenadas 1.6 mm anterior y 3 mm lateral izquierdo con respecto a Bregma (Fig. 6) y a 2 mm de profundidad de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson, 1998. A los animales se les administró gentamicina local sobre la herida y durante 48 horas post-cirugía se les administró como profiláctico enrofloxacina (10 mg/Kg) añadida en el agua, dejando libre acceso

a ella; además se les administró meloxicam (0.85 mg/kg) vía oral como analgésico, antipirético y antiinflamatorio durante el mismo periodo de tiempo.

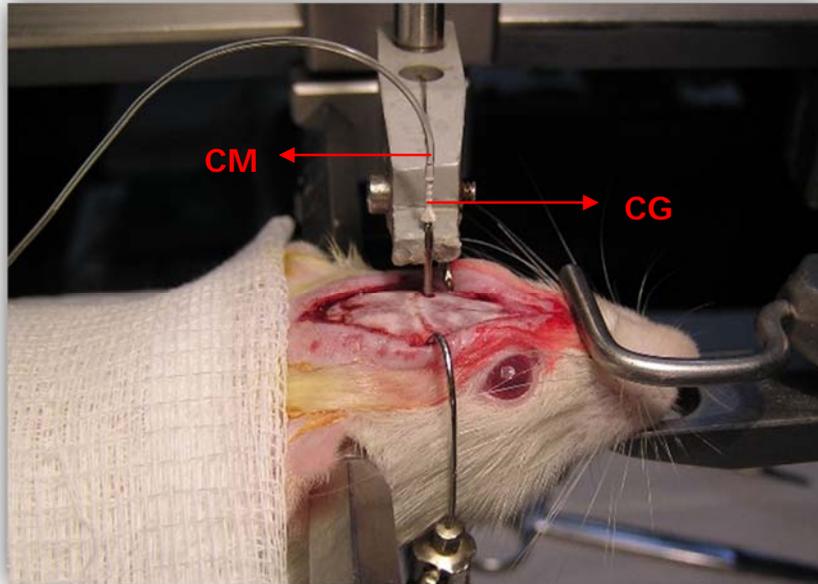


Figura 6. Implante estereotáxico de células U87-GFP en la corteza prefrontal del cerebro de rata. Se observa la cánula de microinyección (CM) calibre 25 con las células y la cánula guía (CG) calibre 21 (Lab. Fisiología de la Formación Reticular, INNyN).

7.2.2 Tratamiento con Transferon®

Trascurridas 4 o 7 semanas del implante, las ratas fueron divididas en dos grupos: G1 y G2 (Tabla 6). El G1 considerado como grupo control, fue administrado con 30 μ L de SSI (Solución Salina Isotónica) y el G2 o tratamiento recibió una dosis de 4.8 μ g de Transferon® en 30 μ L, durante 3.5 semanas (Fig. 7), esto basado en el esquema de administración propuesto por la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional para el tratamiento de una enfermedad aguda (Apéndice i) (Berrón-Pérez, 2007) y con el ajuste de dosis para un modelo en rata de acuerdo a lo estipulado por Reagan-Shaw en el 2008.

Tabla 6. Grupos de estudio.

Tiempo posterior al implante	4 Semanas		7 Semanas	
	G1	G2	G1	G2
Grupos	G1	G2	G1	G2
n	3	4	3	4

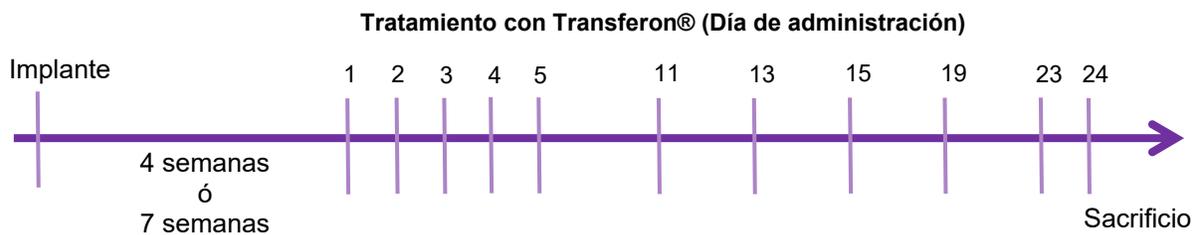


Figura 7. Esquema de administración del Transferon®. Se muestra el día del implante, después de 4 o 7 semanas se administró el tratamiento en los días señalados. El día 24 se realizó el sacrificio de los animales.

7.2.3 Obtención de suero y cerebros

Concluidas las 3.5 semanas de tratamiento, todos los animales fueron anestesiados con una sobredosis de pentobarbital, se realizó un corte medio a la altura del esternón para exponer el corazón, del cual se realizó la extracción de 10 mL de sangre. Posteriormente se realizó una perfusión de gran circuito con 1 mL/g de peso de solución salina y posteriormente 1 mL/g de peso de formalina al 3.7%. Una vez fijados los órganos, se obtuvieron los cerebros y fueron conservados en frascos con formalina para su posterior análisis histológico. Para la obtención del suero, la sangre se dejó reposar durante 2 horas y se centrifugaron las muestras a 3 mil rpm durante 10 minutos.

7.2.3.1 Análisis de interleucinas en suero

La cuantificación de IL-6 en suero se realizó mediante un ensayo de tipo ELISA (R&D Systems™, Quantikine® ELISA), la sensibilidad de este kit es de

21 pg/mL. Todas las muestras y curvas de calibración fueron analizadas por triplicado. La densidad óptica fue determinada a 450 nm.

Análisis estadístico

Los resultados fueron colectados y expresados como la media \pm el error estándar de la cantidad de IL. La diferencia entre grupos fue analizada mediante t de student con una corrección de Welch; los valores de P menores a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos. El análisis fue realizado mediante el programa GraphPad Prism 6.

7.2.4 Inmunofluorescencia

Los cerebros obtenidos previamente fueron conservados en formalina al 3.7%, posteriormente se sumergieron en los siguientes gradientes de sacarosa: 10%, 20% y 30%, cambiados cada 24 horas.

Los cerebros fueron congelados con hielo seco y posteriormente cortados con criostato (Leica CM1850) a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ obteniendo láminas con un grosor de $20\text{ }\mu\text{m}$.

Para la identificación de los antígenos, se realizó la exposición de los epítopes mediante una solución de citrato de sodio (10 mM, pH 6.0), posteriormente se bloquearon los antígenos inespecíficos con albúmina al 5% en solución TBS-Tween 0.1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Enseguida se adicionaron los anticuerpos primarios: rabbit anti-GFP para el marcador de las células tumorales (sc-8334, Santa Cruz Biotechnology) y mouse anti-Ki-67 marcador de proliferación celular (sc-23900, Santa Cruz Biotechnology) a una concentración de $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ y $0.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ respectivamente, se incubaron una noche en refrigeración y en cámara húmeda. Posteriormente, se removieron los anticuerpos con 3 lavados con TBS-Tween 0.1% durante 10 minutos en agitación. Se añadieron los anticuerpos secundarios: Alexa Fluor 488 anti-rabbit $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ y Alexa Fluor 594 anti-mouse $2\text{ }\mu\text{g/mL}$, se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Se realizaron 3 lavados con TBS-Tween 0.1% e inmediatamente se añadió DAPI 300 nM como marcador de núcleos, se incubó durante 7 min y se

realizó un ligero lavado con TBS-Tween 0.1%. Finalmente las laminillas se fijaron en un medio de montaje no fluorescente.

7.2.4.1 Determinación del área dañada y migración celular

Posteriormente, los cortes histológicos previamente tratados fueron observados en el microscopio de fluorescencia (Olympus Bx43). Las imágenes generadas se utilizaron para medir el tamaño y la migración del tumor mediante el programa Image-Pro Plus 7.0 (MediaCybernetics).

Análisis estadístico

Los resultados fueron colectados y expresados como la media \pm el error estándar de la distancia recorrida (μm) o el área dañada (μm^2). La diferencia entre grupos fue analizada mediante t de student con una corrección de Welch; los valores de P menores a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos. El análisis fue realizado mediante el programa GraphPad Prism 6.

7.3 Ensayos *in vitro*

7.3.1 Cuantificación de IL-6 y fosfo-JAK1

7.3.1.1 Cultivo celular

La línea celular U87 (ATCC®: HTB14) se sembró en una caja de 6 pozos y se cultivó en medio DMEM sin rojo de fenol (In Vitro, S.A., México) con 1% de antibiótico-antimicótico (Biowest). Las células se incubaron bajo condiciones estándar a 37°C, 95% de humedad y 5% de CO₂. El medio fue cambiado 24 horas después para obtener una confluencia del 60%. Se añadió una concentración de 100 ng/mL de Transferon® (de acuerdo a lo observado anteriormente) o el equivalente en volumen de PBS a las células tratamiento y control, respectivamente.

7.3.1.2 Western Blot

Para la cuantificación de las proteínas JAK1 y pJAK-1, se utilizó la técnica de Western Blot. Las células fueron lisadas con 200 μ L de Laemmli 2X (Tris HCl pH=6.8 100 mM, SDS al 4%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol al 0.1%) para la extracción de las proteínas. Las muestras obtenidas se incubaron en baño maría a 100 °C durante 5 min, se cargaron 45 μ L de muestra en un gel de poliacrilamida al 7.5% en un equipo de electroforesis (BioRad), se dejó correr a 80 V durante 30 minutos y a 100 V durante 80 minutos. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Millipore) durante 8 horas a 0.04 A. Posteriormente, la membrana fue bloqueada (leche descremada 5%, albúmina 2% en TBS-Tween al 0.1%) durante 1 hora a 37 °C. Se agregaron 500 μ L (3.3 μ g/mL) del anticuerpo primario pJAK1 (Purified Rabbit IgG; R&D Systems AF4510) y se incubó toda la noche, mientras que anti-JAK1 (purified policlonal; Abcam AB47435) se utilizó a una concentración de 1 μ g/mL y se incubó 2 días en refrigeración. Se realizaron 3 lavados de 5 min con TBS-Tween al 0.1% con agitación. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-rabbit peroxidasa (1:10 000) y se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente y con agitación. Se utilizó α -tubulina (8 μ g/mL) como control de carga.

8. Resultados

8.1 Migración

A continuación se muestran fotografías representativas del efecto del Transferon® sobre la capacidad de migración celular de la línea U87-GFP al ser administrado 4 y 7 semanas después del xenotransplante (Fig. 8A-B). Se realizó la cuantificación (μ m) de la distancia recorrida (señalada con flechas rojas) desde la zona del implante, localizado por la formación de un orificio en la corteza, hasta el inicio de la masa tumoral (Fig. 8C); en donde se observó un aumento estadísticamente significativo tanto a las 4 como a las 7 semanas. Es importante señalar que la migración obtenida debido al efecto del Transferon® a las 4 semanas

es 6 veces mayor que el control, mientras que a las 7 semanas el aumento en la migración es solo 2 veces mayor que lo del control.

A.

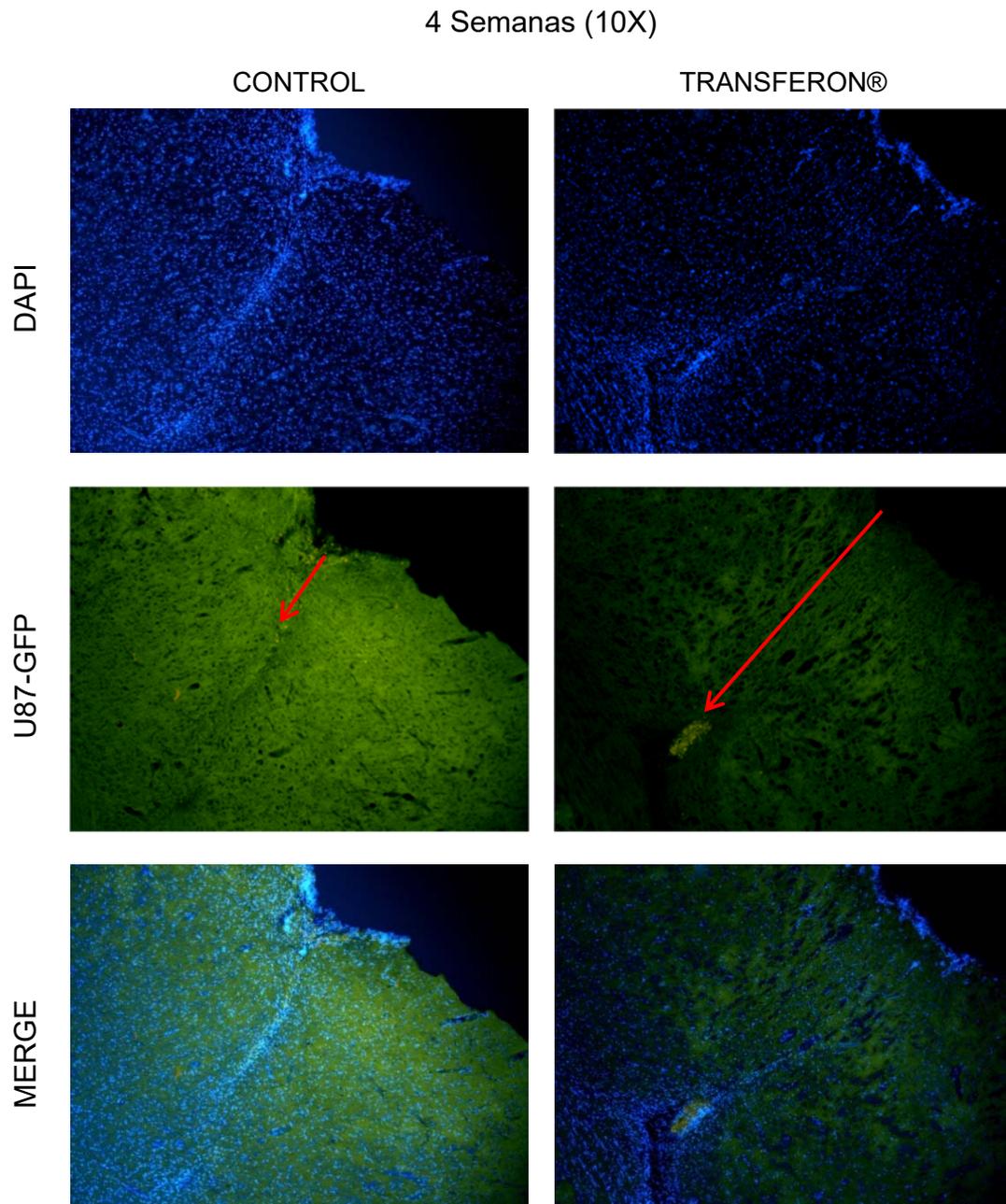


Figura 8A. Consultar pie de figura en la página 40.

B.

7 Semanas (10X)

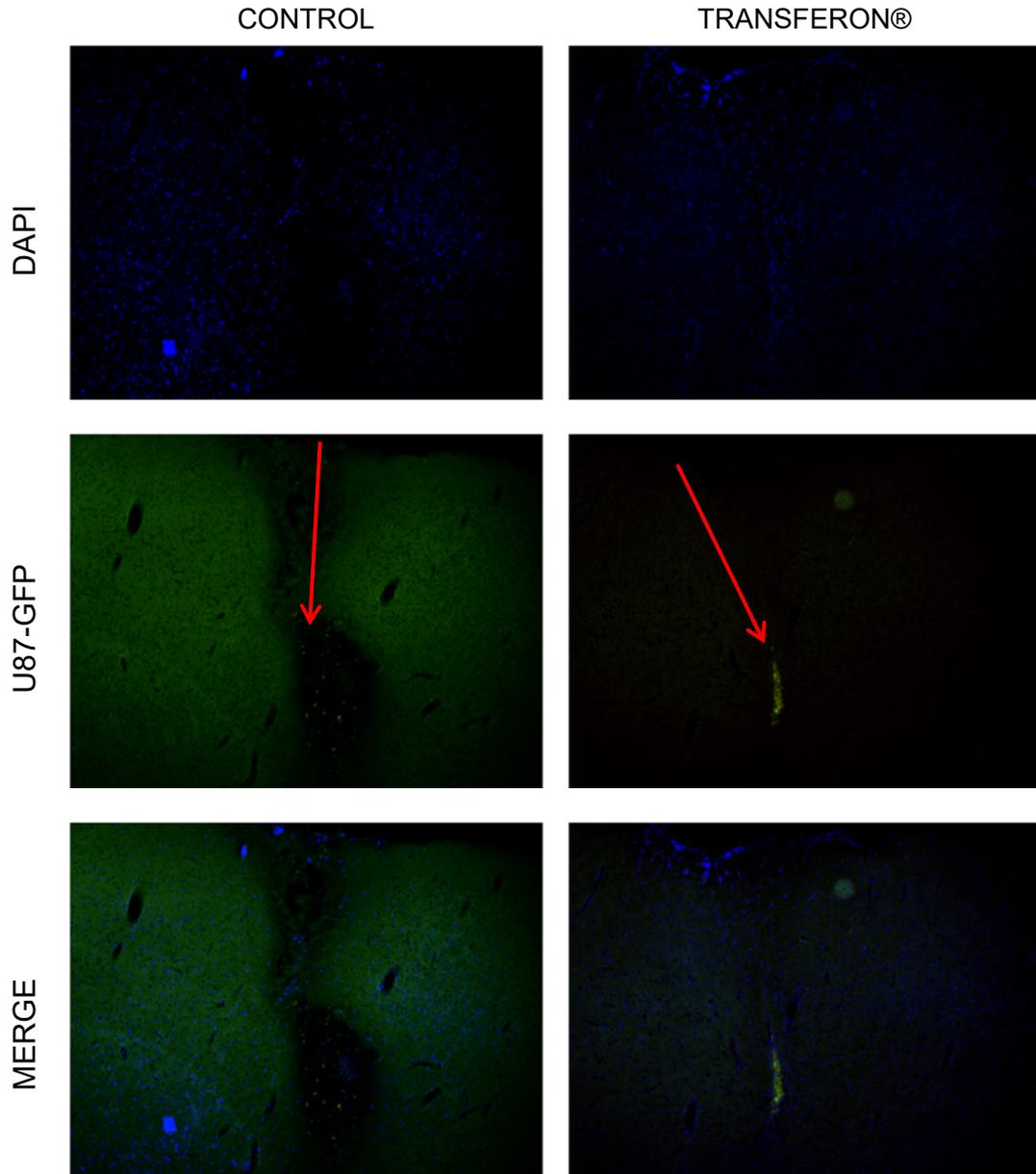


Figura 8B. Consultar pie de figura en la página 40.

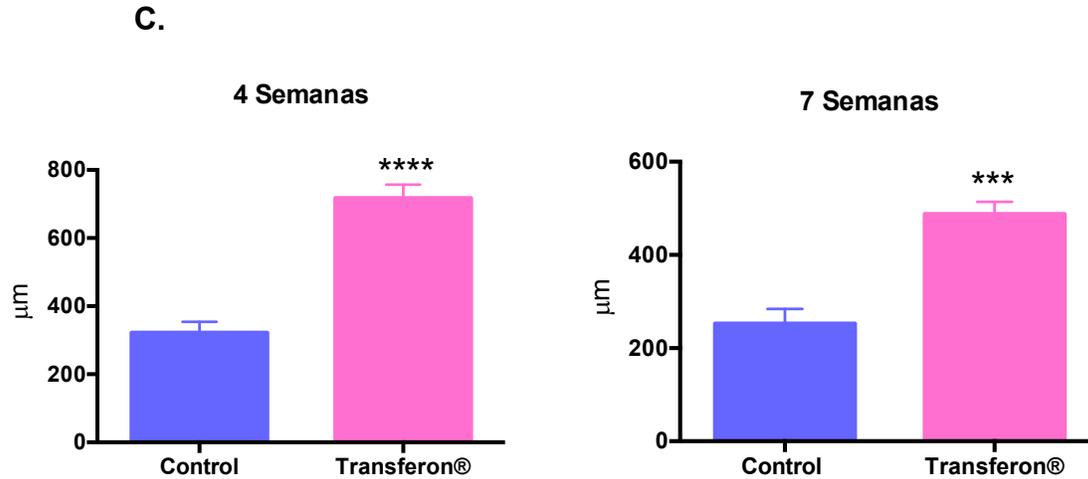


Figura 8. Migración celular. Imagen representativa del grupo control y del tratado con transferon. **A.** Control y Transferon® administrado después de 4 semanas del implante de células U87-GFP. **B.** Tratamiento con Transferon® después de 7 semanas del implante. **C.** Cuantificación de la distancia recorrida por las células (en μm) medida desde el sitio del implante (observado a causa del trépano) hasta el inicio de la masa tumoral formada por las células U87 en las ratas control y ratas tratadas con el Trasferon®. Las barras representan la media \pm ES (***) indica $P < 0.0005$, **** indica $P < 0.0001$ comparado con el control) 4 y 7 semanas: control $n=3$, tratamiento $n=4$.

8.2 Área afectada

Para la cuantificación del área afectada fue considerada la presencia de masas tumorales y/o la aparición de pseudopalisadas que consisten en formaciones celulares constituidas por un núcleo necrótico con hiper celularidad en la periferia, esta característica es utilizada por neuropatólogos para la identificación de GBM (Wippold, 2007). En las figuras 9A y 9B se muestran micrografías representativas de los grupos tratados a las 4 y 7 semanas, respectivamente. En la Fig. 9C se observan las gráficas representativas de dicha cuantificación, en las cuales existe una diferencia estadísticamente significativa, sin embargo, al administrar el Transferon® 4 semanas después del implante, el área afectada es mayor que su control, caso contrario lo ocurrido al ser administrado a las 7 semanas en el cual se observa una disminución del área dañada pero un aumento en la densidad celular. Dado lo anterior, se realizó la cuantificación de la intensidad de fluorescencia

(Fig. 9D), en donde obtuvimos diferencias significativas entre el grupo control y el tratado con el Transferon®.

A.

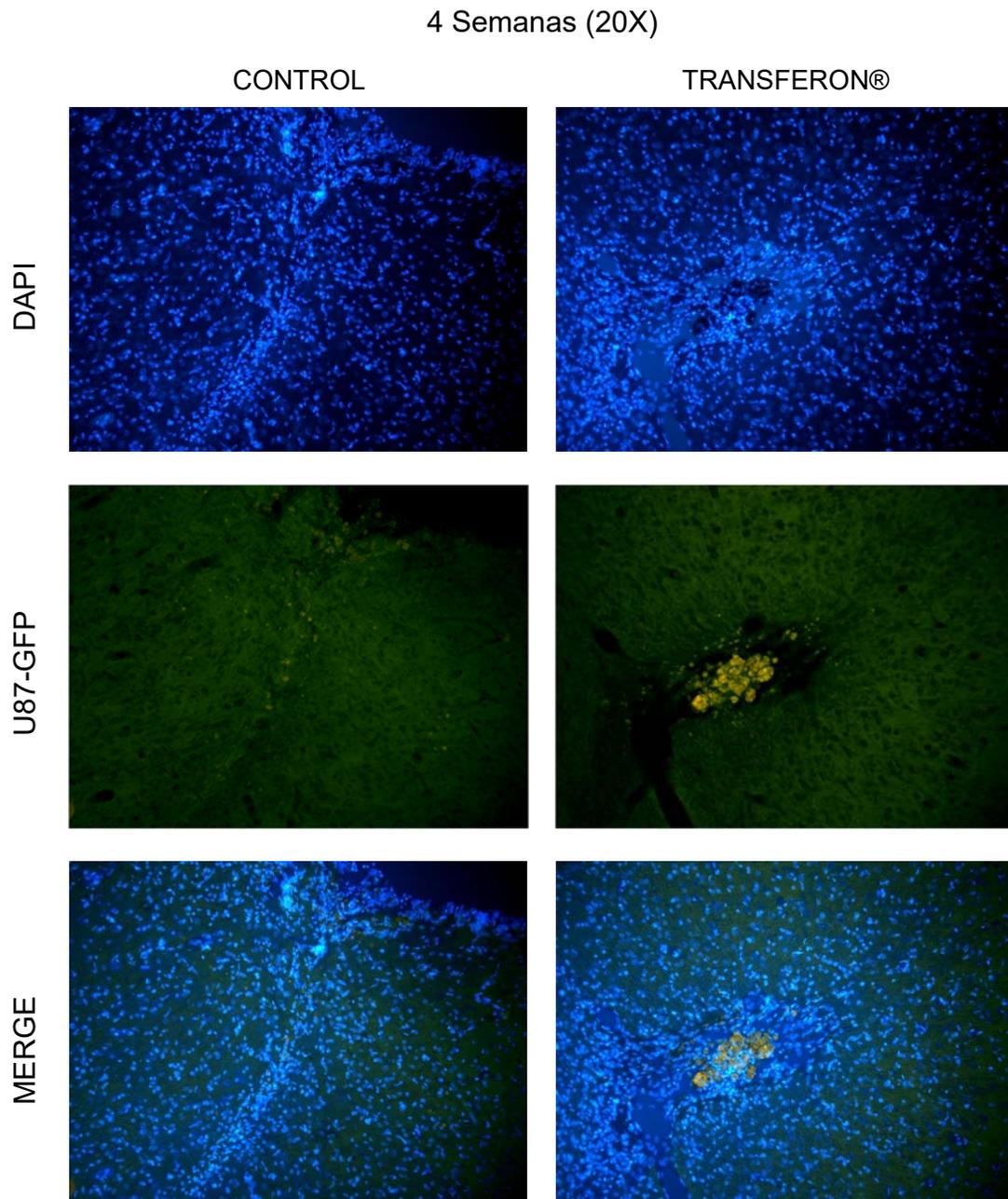


Figura 9A. Consultar pie de figura en la página 43.

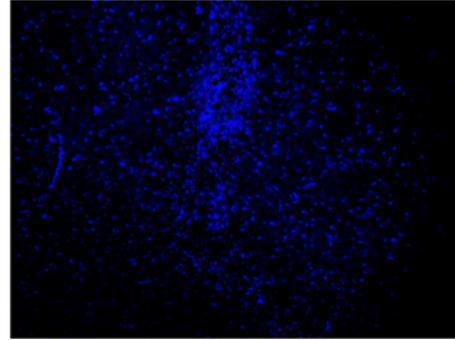
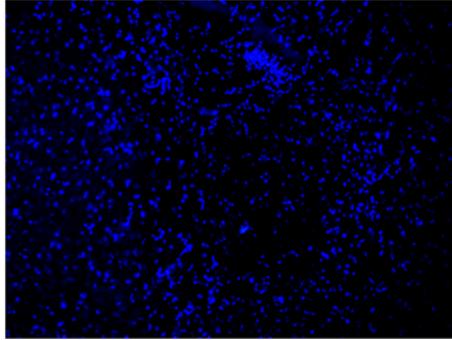
B.

7 Semanas (20X)

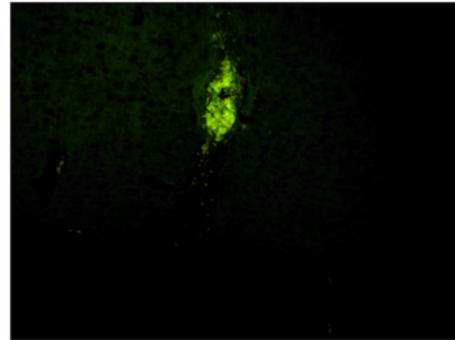
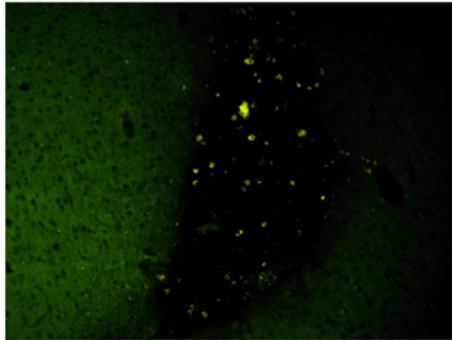
CONTROL

TRANSFERON®

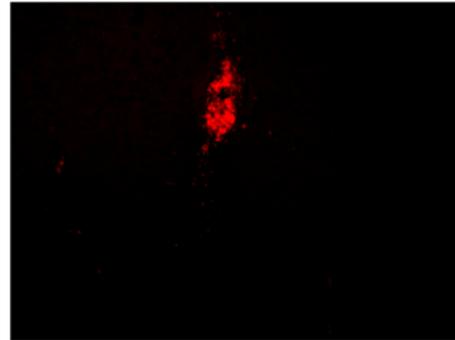
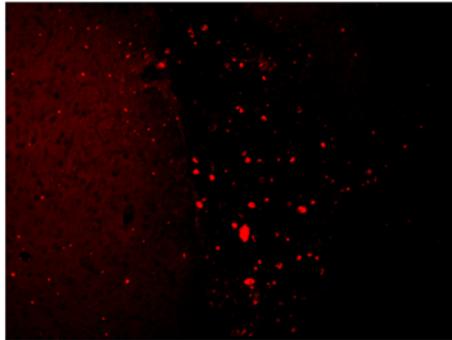
DAPI



U87-GFP



Ki-67



MERGE

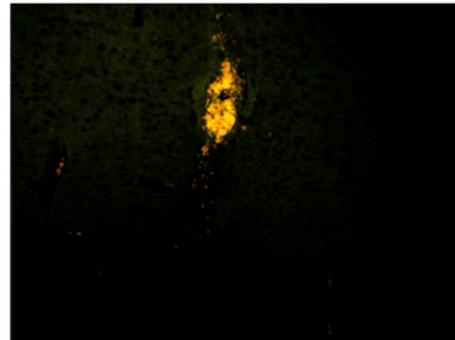
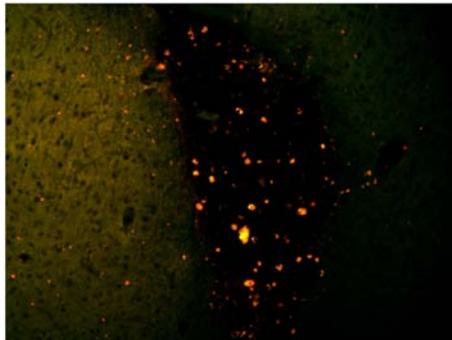
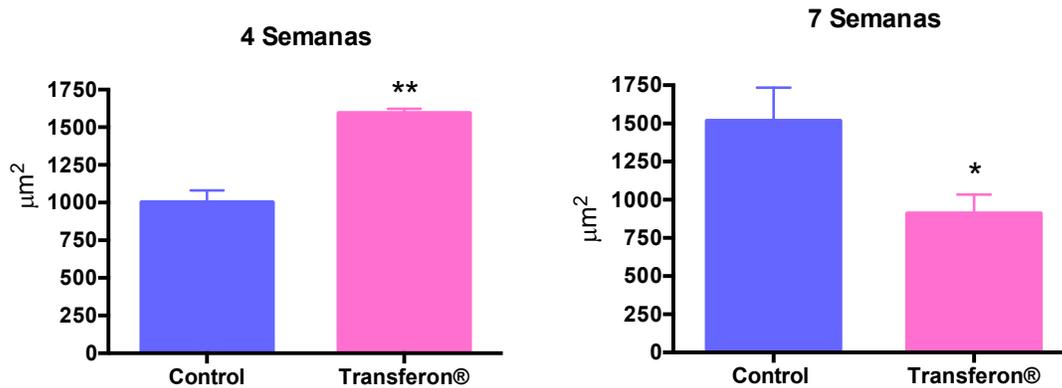


Figura 9B. Consultar pie de figura en la página 43.

C.



D.

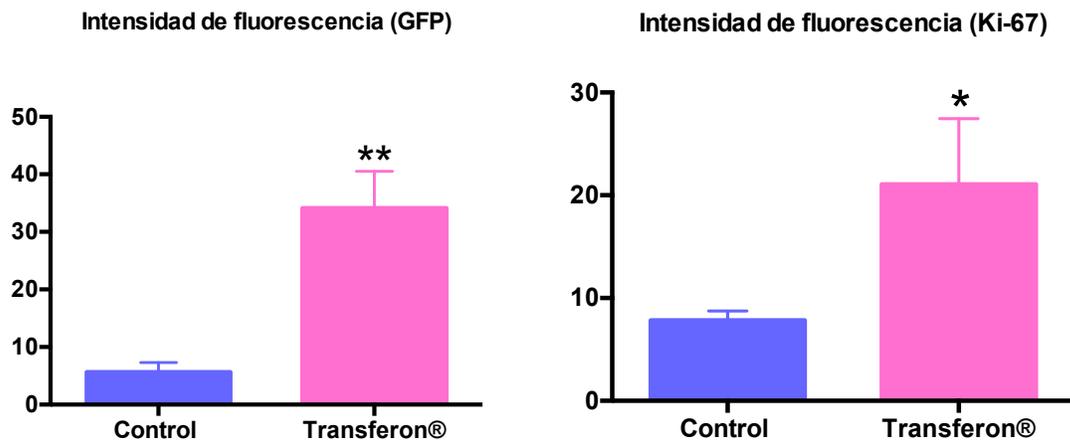


Figura 9. Área afectada. Imagen representativa del grupo control y del administrado con Transferon®. **A.** Control y Transferon® administrado después de 4 semanas del implante de células U87-GFP. **B.** Tratamiento con Transferon® después de 7 semanas del implante. **C.** Cuantificación de la variación del área (en μm^2) formada por las células U87 en ratas control y en las ratas tratadas con el Trasferon®. **D.** Intensidad de fluorescencia determinada a las 7 semanas, GFP: Indica las células U87-GFP, Ki-67: Marcador de proliferación. Las barras representan la media \pm ES (* indica $P < 0.05$ y ** indica $P < 0.005$ comparado con el control) 4 y 7 semanas: control $n=3$, tratamiento $n=4$.

8.3 Análisis de interleucinas en suero

La concentración de la interleucina 6, se muestra en la Fig. 10. Observamos un aumento significativo de la concentración de IL-6 en el suero de las ratas que fueron tratadas con el FT.

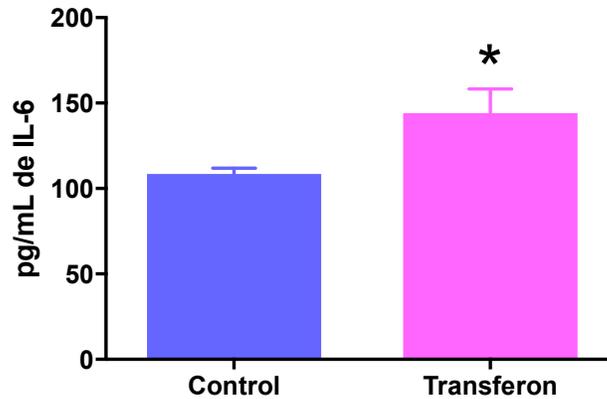


Figura 10. Cuantificación de IL-6. En el gráfico se muestra la variación de la concentración de IL-6 presente en suero de ratas implantadas con células de glioblastoma sin tratamiento y aquellas administradas con Trasferon®. Las barras representan la media \pm ES (* indica $P < 0.05$ comparado con el control) Control: $n = 3$ y Transferon®: $n = 4$.

8.4 Determinación de JAK1-pJAK1

En la figura 11 se muestra el resultado obtenido para la cuantificación de la proteína fosforilada JAK1 y JAK1 total. Al realizar el análisis densitométrico observamos que el FT no aumenta ni disminuye significativamente la relación pJAK1/JAK1.

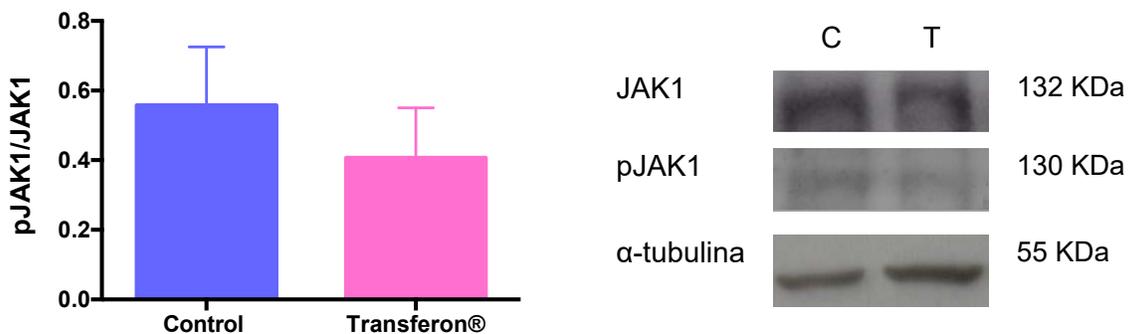


Figura 11. Determinación de pJAK-1 y JAK1. En el gráfico representa el análisis densitométrico de la expresión de pJAK-1 con respecto a JAK-1 total después de realizar 6 experimentos independientes. Las barras representan la media \pm ES. $n = 3$.

9. Discusión

Migración

Los astrocitomas son tumores de naturaleza heterogénea y pueden mostrar infiltración difusa de estructuras cerebrales, ya sean adyacentes o distantes. Particularmente, los GBM están caracterizados por ser los más proliferativos e invasivos (Agnihotri, 2012), por lo que es de suma importancia la determinación del efecto del Transferon® sobre la capacidad de las células U87 de migrar o invadir tejido sano. La invasión celular es un proceso complejo, sin embargo, generalmente es percibido como un proceso multi-etapas. El paso inicial requiere la adhesión de las células tumorales a las proteínas de matriz la cual es mediada por receptor, el segundo paso es la degradación de la matriz por proteasas secretadas por el tumor, lo que origina un espacio dentro del cual las células pueden migrar y activar mecanismos requeridos para la síntesis de membrana y reordenamiento del citoesqueleto (Giese, 2003).

En la Figura 9A se observan los resultados obtenidos al administrar Transferon® 4 semanas después de realizar el xenotransplante de las células U87-GFP. Se muestra un aumento significativo en la capacidad de migración celular cuando es administrado el FT, esto puede atribuirse a la mejora del microambiente tumoral. La migración quimiotáctica de las células es un paso crucial para la invasión. Se han encontrado que estímulos externos como son las quimiocinas o lisofosfolípidos (como el ácido lisofosfatídico), son capaces de regular la migración quimiotáctica en células derivadas de un GBM, esto observado en ensayos *in vitro* de la línea U87 (Lee, 2008).

En la Figura 9B se presenta lo obtenido al administrar el FT 7 semanas después del implante, en donde se observa un aumento significativo en la capacidad para migrar cuando las ratas fueron administradas con el Transferon®, en el caso del GBM, se han descrito un gran número de mediadores de la invasión, incluyendo la activación de las vías de TGF- β y PKB/AKT (*Protein Kinase B*), así como el HIF-1 α generado en zonas de hipoxia (Louis, 2007) y el efecto de un grupo de metalo-cisteína y serina proteasas, las cuales degradan la matriz extracelular (Kesanakurti, 2012). Las células del GBM poseen estas propiedades invasivas

debido a la activación de un patrón genético el cual se encuentra sobre-regulado en procesos típicos de proliferación, remodelación de la matriz extracelular, migración e invasión celular, además de la formación de nuevos vasos sanguíneos (Senft, 2010).

Fascin-1 es una proteína de unión a actina la cual incrementa la movilidad celular en diversos tipos de cáncer. En GBM, la expresión de la proteína fascin-1 está relacionada con el grado histológico, pronóstico y la capacidad de invadir. En estudios *in vitro* con la línea celular U87, se observó un incremento dosis-dependiente de fascin-1 cuando las células fueron estimuladas con IL-6 (Li, 2010), lo que podría explicar el aumento en la capacidad de migración en nuestro modelo ya que la concentración de IL-6 se incrementó en el suero de los animales tratados con el Transferon®.

Área afectada

Pineda y colaboradores en el año 2005, mediante un modelo murino con implante de células C6 derivadas de glioblastoma murino y la administración intratumoral del FT observaron una reducción del volumen del tumor hasta del 41%, lo cual fue atribuido al aumento en la expresión de IFN- γ , TNF- α e IL-12. Sin embargo, es importante señalar que en el modelo utilizado por Pineda et al., el FT es obtenido de cerdos previamente inmunizados con la línea celular C6, el implante fue realizado en el muslo derecho de las ratas y la administración del FT es intratumoral, mientras que en el presente trabajo se propone un modelo que considera la vía de administración más común del FT (vía oral), así como la localización del tumor en la corteza prefrontal.

Contrario a los resultados obtenidos por el grupo de Pineda, en la Figura 9 podemos observar que al administrar el Transferon® existe un aumento significativo del área afectada cuando las ratas fueron administradas 4 semanas después del xenoinjerto (Fig. 9C). Se sabe que aproximadamente el 12% de la masa tumoral corresponde a la asociación de las células tumorales con la microglia o los macrófagos (Mangani, 2017), estas células son reclutadas activamente mediante la secreción de una gran variedad de factores como las quimiocinas, citocinas y

proteínas de matriz (Carvalho da Fonseca, 2013). Al administrar el Transferon® 7 semanas después del implante, se observa una masa tumoral bien delimitada y un incremento en la cantidad de células con respecto al control. En el control interesantemente vemos un área afectada mayor y menos células de tipo U87-GFP cuando se compara con el grupo tratado. Se realizó la cuantificación de la intensidad de fluorescencia (Fig. 9D) ya que se puede considerar como medida indirecta de la densidad celular. La cuantificación nos indica que al administrar el Transferon® 7 semanas después del implante, aumenta significativamente la cantidad de células marcadas con GFP. De igual forma, existe un aumento de la capacidad proliferativa de la línea celular U87-GFP ya que observamos un mayor número de células marcadas con Ki-67, sin embargo, el área dañada disminuye.

Los astrocitos y los oligodendrocitos son las células macrogliales principales. Poseen diversas funciones como son el soporte celular durante el desarrollo del CNS, la homeostasis de iones, la captación de neurotransmisores, neuromodulación, contribuyen al sistema inmune del CNS y la preservan el tejido después del daño, esta última, es la propiedad de los astrocitos activados, llamados también astrocitos reactivos (Ridet, 1997). El efecto de los astrocitos ha recibido mucho menos atención que la microglia, sin embargo, la mayoría de los factores de crecimiento e interleucinas inflamatorias expresadas por microglia, son secretadas también por los astrocitos (Placone, 2015). Los astrocitos sufren gliosis reactiva, un proceso que implica la regulación positiva de los neurofilamentos, la GFAP y la vimentina, así como muchos factores de crecimiento, citocinas inflamatorias y proteínas de matriz extracelular, este proceso ayuda a reparar el daño en el cerebro lesionado (Ridet, 1997). Dado lo anterior se sugiere que al administrar el FT 7 semanas después del implante, los astrocitos reactivos podrían estar ayudando a delimitar la masa tumoral y secretando citocinas antiinflamatorias para la reducción y regeneración del área dañada, tal es el caso de la IL-1, una citocina proinflamatoria encontrada en daño neuropatológico (Hanisch, 2002).

Interleucinas

Además de las células tumorales, las células del sistema inmune y las citocinas constituyen elementos clave en el microambiente del GBM, el cual puede ser favorable para el crecimiento del tumor (Zhu, 2012).

Las citocinas son un grupo de moléculas pequeñas con diversos efectos que dependen del microambiente. Están compuestas por glicoproteínas y polipéptidos que poseen efectos anti-inflamatorios, pro-inflamatorios o efectos de inmunosupresión.

Desde 1990 se ha reconocido la regulación autocrina de la IL-6 en el GBM, así como su asociación con la formación, angiogénesis, grado y prognosis del mismo (Li, 2010). Esta citocina está involucrada en el desarrollo del tumor a través de la promoción de la angiogénesis, proliferación celular y resistencia a la apoptosis y a la radiación (Zhu, 2012). La IL-6 proviene de una familia de citocinas que participan en la activación de JAK/STAT en diversos tipos de cáncer incluidos el GBM en el cual, los altos niveles de IL-6 en circulación están asociados con un incremento en la severidad del tumor (Kesanakurti, 2012). Por lo anterior realizamos la determinación de esta interleucina en suero de ratas con xenotrasplante para observar si existe algún efecto producido por el Transferon®. Como se observa en la Figura 10, la concentración de IL-6 aumentó significativamente en suero de ratas que fueron administradas con el Transferon®. Esto tiene una enorme implicación en cuanto a la severidad del tumor, ya que se sabe que la IL-6 es una potente citocina pro-inflamatoria que se encarga de mediar múltiples funciones fisiológicas, tales son; la diferenciación y desarrollo de linfocitos, la proliferación, supervivencia celular y la mejora de las señales apoptóticas (Kamimura, 2003), sin embargo, también es conocida por su actividad inmunosupresora implicada en la proliferación de células tumorales, así como en la angiogénesis (Fisher, 2014). En experimentos *in vitro* realizados a la línea celular U87, la cual es derivada de un glioblastoma humano, se observó que la IL-6 aumenta la expresión de la metaloproteasa 2 (MMP-2), y produce un incremento en la fosforilación de STAT3, lo que conlleva a la promoción de la invasión de la línea celular U87 (Li, 2010). Se sabe también, mediante estudios *in vitro* realizados con co-cultivos de la línea celular U87 y microglia, que la relación

entre la microglia-glioma se puede llevar a cabo mediante el ligando CCL2 generado por el tumor para el cual, la microglia posee el receptor correspondiente (CCR2) que al entrar en contacto con su ligando, aumenta la liberación de la IL-6 lo que conlleva a un aumento en la capacidad de invasión del glioma (Carvalho da Fonseca, 2013) (Fig 12). CCL2 es conocido también por ser un potente quimioatrayente para monocitos, basófilos, linfocitos T y células NK. También es capaz de inducir la expresión de metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9 en las células cancerosas, promoviendo su invasión. En estudios *in vitro* con la línea celular U87 se ha observado que estimula la migración e invasión (Lim, 2016). Esto podría traducirse en un aumento en la progresión del cáncer.

En un estudio *in vitro* se observó que la línea celular U87 expresa altos niveles de ambos receptores para IL-6 (IL-6R α y GP130), también se observó que la IL-6 induce un notable incremento en la fosforilación de GP130, JAK1, JAK2 y STAT3, observado mediante un western blot (Michaud-Levesque, 2012).

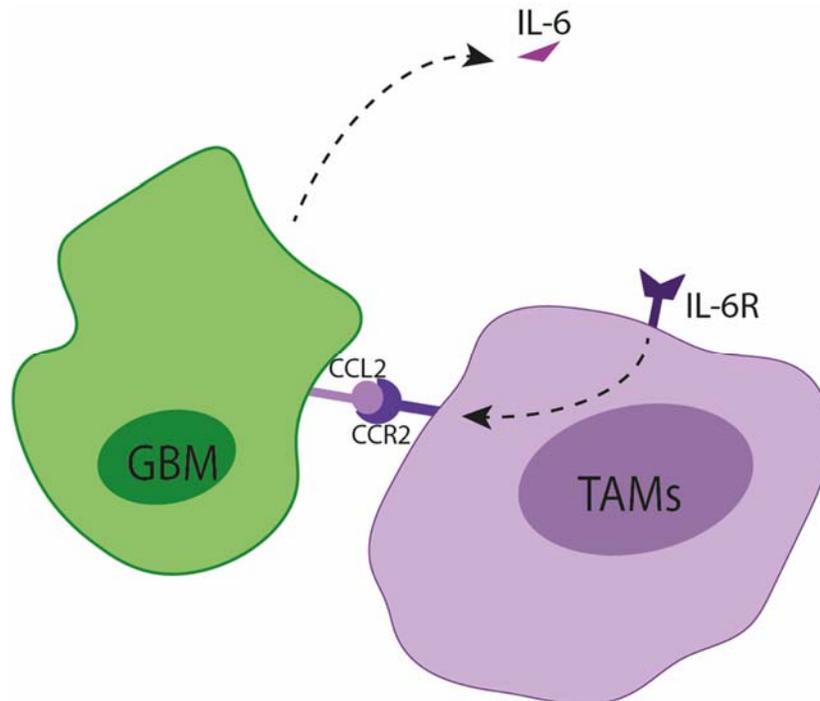


Figura 12. La expresión de IL-6 en macrófagos/microglia. En la asociación de las TAMs se detecta un incremento en la producción de IL-6 lo que conlleva a un aumento en la invasividad de las células del GBM (línea celular U87). Modificado de Zhang, 2011.

Por lo anterior, se ha propuesto a CCL2 como blanco terapéutico prometedor; actualmente, Carlumab es un anticuerpo monoclonal conocido por poseer alta afinidad a CCL2, este fármaco se encuentra en estudios clínicos de fase 1 en combinación con quimioterapia, sin mostrar algún efecto secundario importante (Lim, 2016).

Dado que se observó un aumento de la IL-6 y esta induce un incremento en la fosforilación de gp130, JAK1, JAK2 y STAT3 (Michaud-Levesque, 2012), se realizó la cuantificación de pJAK1 después de la estimulación de la línea celular U87 con Interferón® en un experimento *in vitro* (Fig. 11), sin embargo, no se observó una diferencia significativa comparada con el control.

10. Conclusiones

- El Transferon® aumenta la capacidad de migración de las células U87 implantadas en la corteza prefrontal de ratas a las 4 y 7 semanas después del implante.
- La administración del Transferon® 4 semanas después del implante aumenta el área dañada con respecto al control.
- El tratamiento con Transferon® 7 semanas después del implante disminuye el área dañada mas no la densidad celular con respecto al control.
- La concentración sérica de IL-6 aumenta con la administración del Transferon®.
- La fosforilación de JAK1 no se modifica al inducir las células U87 con Transferon® en un modelo *in vitro*.

11. Perspectivas

- Estudiar la presencia de microglia en el microambiente tumoral mediante el marcador Coronin-1A, proteína expresada constitutivamente en microglia.
- Cuantificar la fosforilación de la proteína JAK-2 al estimular las células con Transferon® para conocer la vía implicada debido al aumento de IL-6.
- Analizar el uso del Transferon® al ser administrado en etapas de desarrollo más avanzadas del glioblastoma.

12. Referencias

- Agnihotri, S., Burrell, K., Wolf, A., Jalali, S., Hawkins, C., Rutka, J. and Zadeh, G. (2012). Glioblastoma, a Brief Review of History, Molecular Genetics, *Animal Models and Novel Therapeutic Strategies. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 61(1), pp.25-41.
- Ahmed, Z., Shaw, G., Sharma, V., Yang, C., McGowan, E. and Dickson, D. (2007). Actin-binding Proteins Coronin-1a and IBA-1 are Effective Microglial Markers for Immunohistochemistry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 55(7), pp.687-700.
- Akaishi, H. (1998). Defective IL-2-mediated IL-2 receptor alpha chain expression in Stat3- deficient T lymphocytes. *International Immunology*, 10(11), pp.1747-1751.
- Akdis, M., Burgler, S., Cramer, R., Eiwegger, T., Fujita, H., Gomez, E., Klunker, S., Meyer, N., O'Mahony, L., Palomares, O., Rhyner, C., Quaked, N., Schaffartzik, A., Van De Veen, W., Zeller, S., Zimmermann, M. and Akdis, C. (2011). Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(3), pp.701-721.
- Albuлесcu, R., Codrici, E., Popescu, I., Mihai, S., Necula, L., Petrescu, D., Teodoru, M. and Tanase, C. (2013). Cytokine Patterns in Brain Tumour Progression. *Mediators of Inflammation*, 2013(1), pp.1-7.
- Bernal, P. (2010). Factor de Transferencia. Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Berrón-Pérez, R., Chávez-Sánchez, R., Estrada-García, I., Espinosa-Padilla, S., Cortez-Gómez, R., Serrano-Miranda, E., Ondarza-Aguilera, R., Pérez-Tapia, M., Pineda, B., Jiménez-Martínez, M., Portugués, A., Rodríguez, A., Cano, L., Pacheco, P., Barrietos, J., Chacón, R., Serafín, J., Mendez, P., Monges, A., Cervantes, E. and Estrada-Parra, S. (2007). Indications, usage, and dosage of the transfer factor. *Revista Alegria México*, 4(54), pp.134-139.
- Bigner, S., Mark, J. and Bigner, D. (1990). Cytogenetics of human brain tumors. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 47(2), pp.141-154.

- Bondy, M., Scheurer, M., Malmer, B., Barnholtz-Sloan, J., Davis, F., Il'yasova, D., Kruchko, C., McCarthy, B., Rajaraman, P., Schwartzbaum, J., Sadetzki, S., Schlehofer, B., Tihan, T., Wiemels, J., Wrensch, M. and Buffler, P. (2008). Brain tumor epidemiology: Consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Cancer*, 113(S7), pp.1953-1968.
- Burnet, N., Lynch, A., Jefferies, S., Price, S., Jones, P., Antoun, N., Xuereb, J. and Pohl, U. (2007). High grade glioma: Imaging combined with pathological grade defines management and predicts prognosis. *Radiotherapy and Oncology*, 85(3), pp.371-378.
- Camby, I., Nagy, N., Lopes, M., Schäfer, B., Maurage, C., Ruchoux, M., Murmann, P., Pochet, R., Heizmann, C., Brotchi, J., Salmon, I., Kiss, R. and Decaestecker, C. (2006). Supratentorial Pilocytic Astrocytomas, Astrocytomas, Anaplastic Astrocytomas and Glioblastomas are Characterized by a Differential Expression of S100 Proteins. *Brain Pathology*, 9(1), pp.1-19.
- Carvalho da Fonseca, A. and Badie, B. (2013). Microglia and Macrophages in Malignant Gliomas: Recent Discoveries and Implications for Promising Therapies. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013(1), pp.1-5.
- CBTRUS, Central Brain Tumor Registry of the United States. (2017). [online] Available at: <http://www.cbtrus.org/> [Accessed 8 Jul. 2017].
- Chesler, D. (2012). The potential origin of glioblastoma initiating cells. *Frontiers in Bioscience*, S4(1), p.190.
- Dello, C., Lisi, L., Tentori, L., Navarra, P., Graziani, G. and Combs, C. (2017). Exploiting Microglial Functions for the Treatment of Glioblastoma. *Current Cancer Drug Targets*, 17(3), pp.267-281.
- Dong, C. and Flavell, R. (2001). Th1 and Th2 cells. *Current Opinion in Hematology*, 8(1), pp.47-51.
- Dougan, M. and Dranoff, G. (2009). Immune Therapy for Cancer. *Annual Review of Immunology*, 27(1), pp.83-117.
- Dunn, G., Old, L. and Schreiber, R. (2004). The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity*, 21(2), pp.137-148.

- Estrada-Parra, S., Velasco-Castrejón, O., Díaz, M. and Padierna, J. (1983). Inmunoterapia de la tuberculosis pulmonar avanzada con factor de transferencia específico. *Salud Pública de México*, 25(6), pp.579-588.
- Farrell, C. and Plotkin, S. (2007). Genetic Causes of Brain Tumors: Neurofibromatosis, Tuberous Sclerosis, von Hippel-Lindau, and Other Syndromes. *Neurologic Clinics*, 25(4), pp.925-946.
- Fisher, D., Appenheimer, M. and Evans, S. (2014). The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment. *Seminars in Immunology*, 26(1), pp.38-47.
- Fritz, A., Percy, C., Jack, A., Shanmugaratnam, K., Sobin, L., Parkin, M. and Whelan, S. (2013). International classification of diseases for oncology. 3rd ed. Geneva: World Health Organization.
- Furnari, F., Fenton, T., Bachoo, R., Mukasa, A., Stommel, J., Stegh, A., Hahn, W., Ligon, K., Louis, D., Brennan, C., Chin, L., DePinho, R. and Cavenee, W. (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes & Development*, 21(21), pp.2683-2710.
- Giese, A., Bjerkvig, R., Berens, M. and Westphal, M. (2003). Cost of Migration: Invasion of Malignant Gliomas and Implications for Treatment. *Journal of Clinical Oncology*, 21(8), pp.1624-1636.
- González, F., Castro, C., Castro-Ramírez, O., Olaya, N., Penagos, P., Zubieta, C. and Melo, G. (2014). Multiform glioblastoma: 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 Neurológica Colombiana*, 30(4), pp.282-289.
- Guardia-Peña, O., Ustáriz-García, C., García-García, M. and Morera-Barrios, L. (2012). Síndrome de hiper IgE. Presentación de un caso. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 28(3), pp.299-305.
- Hanisch, U. (2002). Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*, 40(2), pp.140-155.
- Heim, M. (1999). The Jak-Stat Pathway: Cytokine Signalling from the Receptor to the Nucleus. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 19(1-4), pp.75-120.

- Heimberger, A., Abou-Ghazal, M., Reina-Ortiz, C., Yang, D., Sun, W., Qiao, W., Hiraoka, N. and Fuller, G. (2008). Incidence and Prognostic Impact of FoxP3+ Regulatory T Cells in Human Gliomas. *Clinical Cancer Research*, 16(14), pp.5166-5172.
- Hodge, D., Hurt, E. and Farrar, W. (2005). The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *European Journal of Cancer*, 41(16), pp.2502-2512.
- Homberg, T., Sáenz, V., Galicia-Carreón, J., Lara, I., Cervantes-Trujano, E., Andaluz, M., Vera, E., Pineda, O., Ayala-Balboa, J., Estrada-García, A., Estrada-Parra, S., Pérez-Tapia, M. and Jiménez-Martínez, M. (2015). The Adverse Event Profile in Patients Treated with Transferon®; (Dialyzable Leukocyte Extracts): A Preliminary Report. *Pharmacology & Pharmacy*, 6(2), pp.65-74.
- Jung, C., Foerch, C., Schanzer, A., Heck, A., Plate, K., Seifert, V., Steinmetz, H., Raabe, A. and Sitzer, M. (2007). Serum GFAP is a diagnostic marker for glioblastoma multiforme. *Brain*, 130(12), pp.3336-3341.
- Kamimura, D., Ishihara, K. and Hirano, T. (2003). IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, pp.1-38.
- Karajannis, M. and Zagzag, D. ed., (2015). Subependymal Giant Cell Astrocytoma. In: *Molecular Pathology of Nervous System Tumors*. New York: Springer, pp.142-151.
- Kesanakurti, D., Chetty, C., Dinh, D., Gujrati, M. and Rao, J. (2012). Role of MMP-2 in the regulation of IL-6/Stat3 survival signaling via interaction with $\alpha 5\beta 1$ integrin in glioma. *Oncogene*, 32(3), pp.327-340.
- Krishnaveni, M. (2013). A review on transfer factor an immune modulator. *Drug Invention Today*, 5(2), pp.153-156.
- Lacroix, M., Abi-Said, D., Fournay, D., Gokaslan, Z., Shi, W., DeMonte, F., Lang, F., McCutcheon, I., Hassenbusch, S., Holland, E., Hess, K., Michael, C., Miller, D. and Sawaya, R. (2001). A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *Journal of Neurosurgery*, 95(2), pp.190-198.

- Langowski, J., Zhang, X., Wu, L., Mattson, J., Chen, T., Smith, K., Basham, B., McClanahan, T., Kastelein, R. and Oft, M. (2006). IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature*, 442(7101), pp.461-465.
- Lee, S., Lee, H., Kim, S., Jo, S., Shim, J., Lee, H., Yun, J. and Bae, Y. (2008). Lysophosphatidylserine stimulates chemotactic migration in U87 human glioma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 374(1), pp.147-151.
- Li, R., Li, G., Deng, L., Liu, Q., Dai, J., Shen, J. and Zhang, J. (2010). IL-6 augments the invasiveness of U87MG human glioblastoma multiforme cells via up-regulation of MMP-2 and fascin-1. *Oncology Reports*, 23(6), pp.1553-1559.
- Lim, S., Yuzhalin, A., Gordon-Weeks, A. and Muschel, R. (2016). Targeting the CCL2-CCR2 signaling axis in cancer metastasis. *Oncotarget*, 19(7), pp.28697-28710.
- Lippitz, B. (2013). Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *The Lancet Oncology*, 14(6), pp.e218-e228.
- LoBuglio, A. and Neidhart, J. (1974). A review of transfer factor immunotherapy in cancer. *Cancer*, 34(S8), pp.1563-1570.
- Loda, M., Mucci, L., Mittelstadt, M., Van Hemelrijck, M. and Cotter, M. (2017). *Pathology and Epidemiology of Cancer*. Cham: Springer International Publishing.
- Louis, D., Ohgaki, H., Wiestler, O. and Cavanee, W. (2007). *WHO classification of tumours of the central nervous system*. 4th ed. Lyon: IARC.
- Magaña-Maldonado, R., Chávez-Cortez, E., Olascoaga-Arellano, N., López-Mejía, M., Maldonado-Leal, F., Sotelo, J. and Pineda, B. (2016). Immunological Evasion in Glioblastoma. *BioMed Research International*, 2016, pp.1-7.
- Mangani, D., Weller, M. and Roth, P. (2017). The network of immunosuppressive pathways in glioblastoma. *Biochemical Pharmacology*, 130, pp.1-9.
- Masi, M., De Vinci, C. and Baricordi, O. (1996). Transfer factor in chronic mucocutaneous candidiasis. *Biotherapy*, 9(1-3), pp.97-103.
- Medina-Rivero, E., Vallejo-Castillo, L., Vázquez-Leyva, S., Pérez-Sánchez, G., Favari, L., Velasco-Velázquez, M., Estrada-Parra, S., Pavón, L. and Pérez-

- Tapia, S. (2016). Physicochemical Characteristics of Transferon™ Batches. *BioMed Research International*, 2016(1), pp.1-8.
- Michaud-Levesque, J., Bousquet-Gagnon, N. and Béliveau, R. (2012). Quercetin abrogates IL-6/STAT3 signaling and inhibits glioblastoma cell line growth and migration. *Experimental Cell Research*, 318(8), pp.925-935.
 - Mireles Lozano, R. (2016). Efecto del factor de transferencia en el desarrollo de glioblastomas humanos. Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
 - Muldoon, L., Soussain, C., Jahnke, K., Johanson, C., Siegal, T., Smith, Q., Hall, W., Hynynen, K., Senter, P., Peereboom, D. and Neuwelt, E. (2007). Chemotherapy Delivery Issues in Central Nervous System Malignancy: A Reality Check. *Journal of Clinical Oncology*, 25(16), pp.2295-2305.
 - Nouroz, F., Bibi, F., Noreen, S. and Masood, N. (2016). Natural killer cells enhance the immune surveillance of cancer. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 17(2), pp.149-154.
 - Ohgaki, H. and Kleihues, P. (2005). Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathologica*, 109(1), pp.93-108.
 - Ohgaki, H., Dessen, P., Jourde, B., Horstmann, S., Nishikawa, T., Di Patre, P., Burkhard, C., Schüler, D., Probst-Hensch, N., Maiorka, P., Baeza, N., Pisani, P., Yonekawa, Y., Yasargil, M., Lütolf, U. and Kleihues, P. (2004). Genetic Pathways to Glioblastoma. *Cancer Research*, 64(19), pp.6892-6899.
 - Paladugu, M., Thakur, A., Lum, L., Mittal, S. and Parajuli, P. (2012). Generation and immunologic functions of Th17 cells in malignant gliomas. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 62(1), pp.75-86.
 - Paxinos, G. and Watson, C. (1998). The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press.
 - PDB, Protein Data Bank. (2017). RCSB PDB. [online] Available at: <http://www.rcsb.org/> [Accessed 10 Nov. 2016].
 - Pérez-Carro, R., Cauli, O. and López-Larrubia, P. (2014). Multiparametric magnetic resonance in the assessment of the gender differences in a high-grade glioma rat model. *EJNMMI Research*, 4(1).

- Pineda, B., Estrada-Parra, S., Pedraza-Medina, B., Rodríguez-Ropon, A., Pérez, R. and Arrieta, O. (2005). Interstitial transfer factor as adjuvant immunotherapy for experimental glioma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 24(4), pp.207-213.
- Placone, A., Quiñones-Hinojosa, A. and Searson, P. (2015). The role of astrocytes in the progression of brain cancer: complicating the picture of the tumor microenvironment. *Tumor Biology*, 37(1), pp.61-69.
- Purves, D. (2012). Neuroscience. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates.
- Razavi, S., Lee, K., Jin, B., Aujla, P., Gholamin, S. and Li, G. (2016). Immune Evasion Strategies of Glioblastoma. *Frontiers in Surgery*, 11(3).
- Reagan-Shaw, S., Nihal, M. and Ahmad, N. (2007). Dose translation from animal to human studies revisited. *The FASEB Journal*, 22(3), pp.659-661.
- Reyes Oliveros, F. and Lema Bouzas, M. (2007). Gliomas del encéfalo. [Santiago de Compostela]: Universidade de Santiago de Compostela, Servizo de Publicacións e Intercambio Científico.
- Ridet, J., Privat, A., Malhotra, S. and Gage, F. (1997). Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends in Neurosciences*, 20(12), pp.570-577.
- Rodríguez Flores, A., Serrano Miranda, E., Flores Sandoval, G., Orea, M., García, J., Badillo, A. and Estrada-Parra, S. (2002). El efecto terapéutico del factor de transferencia en el tratamiento de pacientes con dermatitis atópica grave. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*, 11(1), pp.9-11.
- Rønning, P., Helseth, E., Meling, T. and Johannesen, T. (2012). A population-based study on the effect of temozolomide in the treatment of glioblastoma multiforme. *Neuro-Oncology*, 14(9), pp.1178-1184.
- Rothaug, M., Becker-Pauly, C. and Rose-John, S. (2016). The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(6), pp.1218-1227.
- Rozzo, S. and Kirkpatrick, C. (1992). Purification of transfer factors. *Molecular Immunology*, 29(2), pp.167-182.

- Salem, M., Elbaz, O., Zahran, M., Elbaz, A., Elgamal, S., Eteba, S. and Mahmoud, L. (2000). Identification of Predictors of Disease Status and Progression in Patients with Myeloma (MM). *Hematology*, 5(1), pp.41-45.
- Schwartzbaum, J., Fisher, J., Aldape, K. and Wrensch, M. (2006). Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nature Clinical Practice Neurology*, 2(9), pp.494-503.
- Senft, C., Priester, M., Polacin, M., Schröder, K., Seifert, V., Kögel, D. and Weissenberger, J. (2010). Inhibition of the JAK-2/STAT3 signaling pathway impedes the migratory and invasive potential of human glioblastoma cells. *Journal of Neuro-Oncology*, 101(3), pp.393-403.
- Serrano Hernández, A. (2009). Células colaboradoras (TH1, TH2, TH17) y reguladoras (Treg, TH3, NKT) en la artritis reumatoide. *Reumatología Clínica*, 5(1), pp.1-5.
- Steele, R., Myers, M. and Vincent, M. (1980). Transfer Factor for the Prevention of Varicella-Zoster Infection in Childhood Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 303(7), pp.355-359.
- Stupp, R., Mason, W., van den Bent, M., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M., Belanger, K., Brandes, A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R., Ludwin, S., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J., Eisenhauer, E. and Mirimanoff, R. (2005). Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10), pp.987-996.
- Stupp, R., Reni, M., Gatta, G., Mazza, E. and Vecht, C. (2007). Anaplastic astrocytoma in adults. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 63(1), pp.72-80.
- Suganuma, M., Okabe, S., Kurusu, M., Iida, N., Ohshima, S., Saeki, Y., Kishimoto, T. and Fujiki, H. (2002). Discrete roles of cytokines, TNF- α , IL-1, IL-6 in tumor promotion and cell transformation. *International Journal of Oncology*, 20(1), pp.131-136.

- Takeda, K. and Akira, S. (2000). STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 11(3), pp.199-207.
- Tonn, J., Grossman, S., Rutka, J. and Westphal, M. (2006). Neuro-Oncology of CNS Tumors. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Wainwright, D., Sengupta, S., Han, Y. and Lesniak, M. (2011). Thymus-derived rather than tumor-induced regulatory T cells predominate in brain tumors. *Neuro-Oncology*, 13(12), pp.1308-1323.
- Wegman-Ostrosky, T., Reynoso-Noverón, N., Mejía-Pérez, S., Sánchez-Correa, T., Alvarez-Gómez, R., Vidal-Millán, S., Cacho-Díaz, B., Sánchez-Corona, J., Herrera-Montalvo, L. and Corona-Vázquez, T. (2016). Clinical prognostic factors in adults with astrocytoma: Historic cohort. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 146, pp.116-122.
- Weissenberger, J., Loeffler, S., Kappeler, A., Kopf, M., Lukes, A., Afanasieva, T., Aguzzi, A. and Weis, J. (2004). IL-6 is required for glioma development in a mouse model. *Oncogene*, 23(19), pp.3308-3316.
- Wippold, F., Lämmle, M., Anatelli, F., Lennerz, J. and Perry, A. (2007). Neuropathology for the Neuroradiologist: Palisades and Pseudopalisades. *American Journal of Neuroradiology*, 27(10), pp.2037-2041.
- Wolvekamp, M. and Marquet, R. (1990). Interleukin-6: historical background, genetics and biological significance. *Immunology Letters*, 24(1), pp.1-9.
- Xie, Z. (2009). Brain Tumor Stem Cells. *Neurochemical Research*, 34(12), pp.2055-2066.
- Zhang, J., Sarkar, S., Cua, R., Zhou, Y., Hader, W. and Yong, V. (2011). A dialog between glioma and microglia that promotes tumor invasiveness through the CCL2/CCR2/interleukin-6 axis. *Carcinogenesis*, 33(2), pp.312-319.
- Zhu, V., Yang, J., LeBrun, D. and Li, M. (2012). Understanding the role of cytokines in Glioblastoma Multiforme pathogenesis. *Cancer Letters*, 316(2), pp.139-150.

Apéndice

Tabla i. Esquema de administración propuesto por la ENCB/IPN.

Tipo de enfermedad	Intervalo	Tiempo	Unidades
Crónica	Todos los días	5 días	5
	Dos veces al día	2.5 semanas	10
	Una vez al día	10 semanas	10
	Total	13 semanas	25
Aguda	Dos veces al día	5 días	10
	Una vez al día	10 semanas	10
	Total	15 semanas	25