



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas Odontológicas y de la Salud
División de Estudios de Posgrado e Investigación
Ciencias Odontológicas

**Evaluación de una inmunotoxina IgY acoplada a abrina para la
eliminación de células madre carcinogénicas CD133+ de glioblastoma**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
ELDA GEORGINA CHÁVEZ CORTÉZ

TUTOR
Dr. Benjamín Pineda Olvera
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, SSA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. Julio E. Sotelo Morales
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, SSA

Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez
Facultad de Odontología, DEPeI, UNAM

Dr. Oscar Gerardo Arrieta Rodríguez
Instituto Nacional de Cancerología, SSA

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

septiembre 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.

El presente trabajo fue realizado como parte del Doctorado en Ciencias del programa de Doctorado y Maestría en Ciencias Médicas Odontológicas y de la Salud de la Universidad Nacional Autónoma de México en colaboración con el Departamento de Neuroinmunología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velazco Suarez”, bajo la dirección del Dr. Benjamín Pineda Olvera con el proyecto CONACYT CB-180851 y FOSSIS 182362.

La alumna fue becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), durante el periodo de agosto del 2013 a julio del 2017 con el Número de Registro 245576 y Número de Beca 362148.

Índice General

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. ANTECEDENTES	
3.1 Astrocitomas (Glioma).....	5
3.2 Glioblastoma.....	6
3.3 Clasificación y etiología del glioblastoma.....	7
3.4 Células troncales carcinogénicas.....	8
3.4.1 Células troncales carcinogénicas de GBM.....	9
3.5 Proliferina.....	10
3.5.1 Proliferina-1.....	11
3.6 Tratamiento del GBM.....	14
3.7 Inmunotoxinas.....	16
3.7.1 Inmunotoxinas en gliomas.....	17
3.8 Anticuerpo IgY.....	20
3.9 Proteínas inhibidoras de ribosomas (RIPs).....	23
3.10 Expresión y producción de la proteína CD133.....	25
3.11 Producción de IgY anti CD133.....	26
3.12 Diseño y expresión de la cadena A de abrina.....	27
4. JUSTIFICACIÓN.....	28
5. HIPÓTESIS.....	29
6. OBJETIVO GENERAL.....	29

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
8. MATERIAL Y MÉTODOS	
8.1 Purificación del anticuerpo IgY anti CD133+.....	30
8.2 Purificación de la cadena A de abrina.....	31
8.3 Western blot	32
8.4 Formación de los conjugados	33
8.5 Cultivos celulares	34
8.6 Separación de GSG	34
8.7 Determinación de la expresión de CD133+.....	35
8.8 Evaluación de la citotoxicidad por cristal violeta.....	36
8.8.1 Ensayo de MTT.....	37
8.9 Análisis estadístico.....	37
9. RESULTADOS	
9.1 Purificación de la cadena A de abrina.....	38
9.2 Purificación del anticuerpo IgY anti CD133+.....	39
9.3 Formación del conjugado IgY anti-CD133 con la abrina.....	40
9.4 Efecto de IgY, abrina y de la inmunotoxina en GBM.....	41
10. DISCUSIÓN.....	47
11. CONCLUSIÓN.....	52
12. ANEXOS	
12.1 Ensayo <i>in vivo</i>	53
12.2 Modelo de implatación subcutánea.....	53
12.3 Tratamiento con la inmunotoxina.....	53
12.4 Resultados preliminares.....	54
13. Productos de la investigación.....	56
14. REFERENCIAS.....	57

ABREVIATURAS

- AOP-1** proteína antioxidante
- ATCC** American Tissue Culture Collection
- BHE** barrera hematoencefálica
- CNTF** factor neutrófico ciliar
- CRM107** toxina difteria con mutación puntual
- CSC** células madre carcinogénicas
- DMEM** medio esencial mínimo de Eagle
- EDTA** ácido etilendiaminotetraacético
- EGF** factor de crecimiento epidérmico
- EGFR** receptor del factor de crecimiento epidérmico
- ERO** especies reactivas de oxígeno
- FGF** factor de crecimiento fibroblástico
- GBM** glioblastoma
- GSCs** células troncales del glioblastoma
- IGF** factor de crecimiento de insulina
- IP** intraperitoneal
- IPTG** isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido
- IT** intratumoral
- mAb** anticuerpo monoclonal
- MAPK** proteína quinasa activada por mitógenos

MTT bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

NSCs células troncales neuronales

OMS Organización Mundial de la Salud

PBS buffer fosfato salino

PE exotoxina de *Pseudomona spp*

PDGF factor de crecimiento derivado de plaquetas

PDGFR receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas

1. RESUMEN

El Glioblastoma (GBM) es el tumor maligno del SNC más frecuente en el adulto. A pesar de los múltiples avances en la terapéutica, el pronóstico de estos tumores es pobre. Debido a la naturaleza difusa del GBM, es difícil la completa resección del tumor y por tanto las células malignas residuales causan la recidiva. Se ha sugerido que la presencia de células troncales de GBM (GSCs) podría ser otra causa de esta recurrencia. Las células troncales carcinogénicas o también denominadas células madre carcinogénicas (CSCs) usualmente son citadas como la principal causa en la falla del tratamiento, así como consideradas las responsables del incrementar la resistencia a las terapias convencionales.

Se ha descrito que algunas toxinas, como la toxina difteria y exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, tiene la ventaja de ser altamente citotóxicas y fáciles de manipular por métodos de ingeniería genética. La ricina y la abrina son unas de las sustancias más tóxicas producidas por plantas, que han sido consideradas en el diseño y uso de inmunotoxinas para aumentar la eficacia en el tratamiento del cáncer. En este trabajo construimos una inmunotoxina usando la cadena A de abrina conjugada a la inmunoglobulina IgY, ya que la producción de inmunoglobulinas IgY es una técnica biotecnológica sencilla, de bajo costo y fácil extracción a partir de la yema de huevo. En un trabajo previamente realizado en el laboratorio se utilizaron técnicas de ADN recombinante para la producción del CD133 y la cadena A de abrina, se clonaron en un vector de expresión de *E. coli* pET28a. El anticuerpo IgY anti-CD133 se obtuvo mediante inmunización por vía intramuscular de gallinas.

Por lo que el objetivo de este proyecto es evaluar la efectividad *in vitro* de la inmunotoxina en CSC-CD133+ de GBM.

Material y métodos: Los anticuerpos específicos anti-CD133 y la cadena A de abrina, se aislaron por cromatografía de afinidad. El acoplamiento del anticuerpo IgY anti-CD133 con la toxina de abrina, se realizó con reactivo SMPT (4-sucinimidiloxycarbonil- α -[2-piridilditiol]tolueno). Se evaluó la citotoxicidad de la toxina, la IgY y la inmunotoxina mediante ensayo con cristal violeta y MTT.

Resultados: El gel SDS-PAGE muestra la inmunoglobulina IgY anti-CD133 purificada, así como la cadena A de abrina y el acoplamiento con SMPT (en un peso 150kDa). Se purificaron GSCs de la línea celular C6 y se determinó viabilidad celular, los resultados mostraron que la inmunotoxina a las 24 h redujo la viabilidad celular 51% con respecto al control, mientras que en 48 y 72 h la disminución fue de 33% y 55% respectivamente. El tratamiento con el anticuerpo IgY no induce toxicidad celular ya que mostró un porcentaje de viabilidad celular de alrededor del 90%; mientras que el tratamiento con la abrina redujo la viabilidad en la línea celular A-172 hasta 33% con respecto al control a las 24. Los resultados obtenidos muestran que la inmunotoxina IgY-abrina presenta actividad citotóxica específica sobre CSC-CD133+ de GBM.

Conclusiones: Los resultados mostraron que logramos producir la inmunotoxina mediante el acoplamiento de la inmunoglobulina IgY-CD133 y la abrina. En los ensayos de viabilidad la inmunotoxina IgY-abrina presentó actividad citotóxica específica sobre CSC-CD133+ de GBM.

2. ABSTRACT

Glioblastoma is the most common and malignant tumor in the Central Nervous System in adult. Despite the multiple advances in therapeutics, the prognosis is poor. Because of the diffuse nature of GBM, complete tumor resection is difficult and therefore residual malignant cells cause relapse. Glioblastoma stem cells (GSCs) are usually cited as the leading cause of treatment failure, as well as those responsible for increasing tumor recurrence. Therefore, in this work we propose the use of toxins directed towards the elimination of this subpopulation, for being highly cytotoxic and easy to manipulate by genetic engineering methods.

Ricin and abrin are a type of ribosome inhibitor proteins (RIPs), one of the most toxic substances produced by plants, which have been considered in the design and use of immunotoxins to increase efficacy in the treatment of cancer. In this work for the construction of immunotoxin we used A chain of abrin conjugated to the immunoglobulin IgY, since the production of IgY immunoglobulins is a simple biotechnological technique, low cost and easy extraction from egg yolk.

Material and methods: Anti-CD133 specific antibodies and abrin A chain were isolated by affinity chromatography. The coupling of the anti-CD133 IgY antibody with the abrin toxin was performed with SMPT reagent (4-succinimidylloxycarbonyl- α -[2-pyridyldithio] toluene). The cytotoxicity of the toxin, IgY and immunotoxin was assessed by crystal violet and MTT assay.

Results: Production of the immunotoxin was obtained by coupling the immunoglobulin IgY-CD133 and abrin. SDS-PAGE gels showed purified anti-CD133 IgY immunoglobulin as well as the A-chain of abrin and coupling with SMPT (at a 150 kDa weight). CSCs were purified from C6 cell line and cell viability was determined, the results showed that immunotoxin at 24 h reduced viability by 51% with respect to control, whereas in 48 h and 72 h the decrease was 33% and 55% respectively. Treatment with the IgY antibody does not induce cellular toxicity, since it shows a viability of about 90%; while abrin treatment reduced cell viability by 33% over control at 24 hours.

Conclusion: The results show that IgY-abrin immunotoxin has specific cytotoxic activity on GSC CD133+.

3. ANTECEDENTES

3.1 Astrocitomas (Glioma)

Los gliomas forman un grupo heterogéneo de tumores del sistema nervioso central (SNC) son clasificados con base a su tipo histológico y grado de malignidad (Perry & Wesseling, 2016). Por mucho tiempo, los gliomas han sido diagnosticados y denominados por sus características y similitudes con las células de la glía (R. Chen, Smith-Cohn, Cohen, & Colman, 2017). En el 2007 la Organización Mundial de la Salud (OMS) los clasifico como grupo principal de tumores gliales, incluyendo tumores astrocíticos, tumores oligodendrogiales, tumores oligoastrocíticos, tumores ependimales, neuronales y tumores neuro-gliales mixtos. Este grupo se divide en grado I como atrociomas pielociticos, xantoastrocitomas pleomorficos y astrocitomas de células gigantes subependimales, grado II incluyen oligodendrogliomas y astrocitomas, grado III oligodendrogliomas anaplásicos, astrocitomas anaplásicos, oligoastrocitomas anaplásicos y ependimomas anaplásicos, y grado IV glioblastomas (GBM) (Louis et al., 2007).

Los gliomas malignos son caracterizados por presentar alteraciones genéticas, activación de vías de transducción de señales e interrupción de la maquinaria del ciclo celular, en estos procesos participan genes y proteínas implicados en la regulación de la diferenciación durante la citogénesis y pueden influir en el estado de diferenciación y desdiferenciación de las células (Dai & Holland, 2003). En el proceso de diferenciación el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor neutrófico ciliar (CNTF), el factor de crecimiento de insulina (IGF), el

homólogo Sonic hedgehog (SHH), son mitogénicos para la proliferación celular, la señalización de RAS/proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y también influyen en el número de astrocitos y en la muerte celular por apoptosis (Bergmann, Tugentman, Shilo, & Steller, 2002).

3.2 Glioblastoma

El Glioblastoma (GBM) es el tumor más común del SNC con una supervivencia media de 10 a 12 meses (Chaichana, Parker, Olivi, & Quiñones-Hinojosa, 2010). Es un tumor heterogéneo en cuanto a las poblaciones celulares, se pueden observar células gliales maduras e inmaduras (McLendon & Rich, 2011). El GBM sigue siendo principalmente un diagnóstico histológico, consistiendo en astrocitos neoplásicos poco diferenciados, sus características histológicas incluyen atipia celular y nuclear, incremento en la actividad mitótica, neoangiogénesis, trombosis vascular y necrosis con pseudoempalizada (Reardon, Rich, Friedman, & Bigner, 2006).

Es más frecuente en pacientes entre 55 y 87 años (Daga, Bottino, Castriconi, Gangemi, & Ferrini, 2011), esta enfermedad es más común en hombres que en mujeres y es menos común entre las poblaciones negras comparadas con las caucásicas (Wen & Kesari, 2008). Solo menos del 5% de los pacientes presentan antecedentes familiares (Farrell & Plotkin, 2007) y el único factor de riesgo conocido es la exposición a radiación ionizante (Fisher, Schwartzbaum, Wrensch, & Wiemels, 2007).

Los signos y síntomas más frecuentes de presentación para los pacientes con este tumor son dolores de cabeza progresivos, convulsiones y déficits neurológicos focales. No hay recomendaciones estándar de detección en individuos

asintomáticos. Estos tumores crecen agresivamente, invadiendo rápidamente el parénquima cerebral y dando lugar a síntomas clínicos (Kanu et al., 2009).

3.3 Clasificación y etiología del glioblastoma

La hipótesis principal sobre el origen del cáncer y también de los gliomas se basa en la teoría de la mutación somática (Boveri T: Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. Gustav Fisher, Jena. 1914). El origen celular de los gliomas sigue siendo una cuestión de discusión. Una de las hipótesis principales sobre la patogénesis del GBM es la “hipótesis de las células troncales”, la cual postula que las células tumorales se originan a partir de células troncales específicas y describe una cierta jerarquía de las células en el tumor (Gürsel et al., 2011). Las CSCs son las de mayor jerarquía y se considera que se originan a partir de la transformación de células troncales neuronales (NSCs) (Dimov, Tasić-Dimov, Conić, & Stefanovic, 2011).

El GBM puede ser primario o secundario (Bralten & French, 2011). El GBM primario, es una lesión de *novo*, son más frecuentes y usualmente se presentan en pacientes >50 años. Se caracteriza por presentar alteraciones genéticas como delección de genes homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) (Kleihues & Ohgaki, 1999) en el cromosoma 10 y delección de p16, pérdida de heterocigosidad en cromosomas 10q y 17p (Yoshida, 1996). Sobreexpresa el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y su ligando independiente mutante EGFRvIII (Frederick, Wang, Eley, & James, 2000).

Los GMB secundarios surgen de gliomas de grado inferior y durante algunos años progresan a GBM, estos tumores son más comunes en jóvenes. Suelen tener

mutaciones el gen supresor tumoral p53 (Field & Shenton, 1975), anomalías en las vías de p16 y retinoblastoma y aberraciones en el número de copias de ADN. El receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) también está frecuentemente sobreexpresado, por lo que produce la activación de las mismas vías EGFR y EGFRvII (Lokker, Sullivan, Hollenbach, Israel, & Giese, 2002).

3.4 Células troncales carcinogénicas

Las CSCs son definidas como células indiferenciadas con capacidad de autorenovación, diferenciación en múltiples linajes e iniciar tumores que imitan el tumor de origen. Los vínculos entre el cáncer y las células troncales se han propuesto durante años, porque diversas vías que se alteran en las células cancerosas regulan las funciones normales de las células troncales embrionarias y adultas. Sin embargo, aún no está claro si las CSCs derivan de células troncales adultas, o si las mutaciones en células progenitoras o incluso una célula diferenciada conducen a una célula tumoral con características de células troncal (Gilbert & Ross, 2009).

El descubrimiento de las CSCs en tumores sólidos malignos (Sell, 2004) y hematopoyéticos (Lapidot et al., 1994) influyó en el entendimiento de la carcinogénesis tumoral (Dean, Fojo, & Bates, 2005). En este modelo se planteó que las células madre son un pequeño subgrupo de células tumorales, las cuales constituye un reservorio de células con capacidad de autosustento y autorenovación, y que ésta población es la responsable de la iniciación, mantenimiento y progresión tumoral (Clarke et al., 2006). Células con estas

propiedades, han sido aisladas de diferentes tipos de cáncer incluyendo leucemia (Bonnet & Dick, 1997), mama (Al-Hajj, Wicha, Benito-Hernandez, Morrison, & Clarke, 2003), próstata (Collins, Berry, Hyde, Stower, & Maitland, 2005), páncreas (C. Li et al., 2007), colon (O'Brien, Pollett, Gallinger, & Dick, 2007), hueso (Gibbs et al., 2005) y cerebro (Galli et al., 2004)

Evidencias recientes sugieren que las CSCs poseen un incremento en la activación de puntos de control de daños del ADN y un sistema de reparación de ADN más eficaz (S. Bao et al., 2006). En consecuencia, CSCs han mostrado una mayor resistencia a las actuales estrategias de tratamiento convencionales, como la quimioterapia (Dean et al., 2005) y radioterapia (Hambardzumyan, Squatrito, Squartro, & Holland, 2006).

3.4.1 Células madre carcinogénicas de GBM

Durante muchos años, se supuso que el cerebro contenía células mitóticas sólo durante el desarrollo temprano. Sin embargo, actualmente se ha visto que la neurogénesis persiste a lo largo de la vida, debido a la presencia de NSCs. En el cerebro adulto, las NSCs se localizan principalmente en la zona subventricular (ALTMAN, 1963) y en el giro dentado (Altman & Das, 1965). NSCs y CSCs comparten muchas características, ambos tipos de células expresan marcadores de células troncales, migran a través del tejido cerebral normal y son capaces de autorenovación. Además, la composición heterogénea de tumores cerebrales, que puede incluir múltiples linajes neuronales, postula la presencia de CSCs (Gilbert & Ross, 2009).

Las células troncales carcinogénicas de GBM (GSCs) fueron las primeras CSCs descritas en tumores sólidos. La existencia de GSCs actualmente es ampliamente aceptada y se les considera como las responsables de la tumorigénesis, progresión y recidiva del GBM (Galli et al., 2004; Singh et al., 2004). Fueron denominadas así debido a sus características semejantes a las células troncales mesenquimales, como autorenovación, alta habilidad de proliferación, expresión de marcadores de células troncales neurales y capacidad de diferenciarse en linajes neuronales (Dirks, 2008) (Sulman, Aldape, & Colman, 2008) (Piccirillo, Binda, Fiocco, Vescovi, & Shah, 2009). Las GSCs incrementan el crecimiento vascular mediante la expresión de altos niveles del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) debido a hipoxia (S. Bao et al., 2006).

Las GSCs expresan marcadores específicos como nestina, CD133, Musashi-1, Sox-2 y CD44 (Cho et al., 2013); (Dimov et al., 2011) (Sanai, Alvarez-Buylla, & Berger, 2005) (Motaln et al., 2012). CD133 o prominina-1, es una proteína de superficie conocida originalmente como un marcador de células troncales hematopoyéticas que posteriormente fue considerada como marcador de células troncales en otros tejidos sanos (Singh et al., 2003) (Richardson et al., 2004).

3.5 Prominina

Prominina es una glicoproteína de membrana pentamérica caracterizada en 1997 (Weigmann, Corbeil, Hellwig, & Huttner, 1997) (Miraglia et al., 1997). Debido a que fue considerada como un importante marcador de superficie celular (Bhatia, 2001) (Corbeil, Röper, Fargeas, Joester, & Huttner, 2001), se ha utilizado ampliamente para identificar y aislar células troncales de diferentes tejidos, incluyendo SNC y

hematopoyético (Yin et al., 1997) (Uchida et al., 2000). Se han reportado varias secuencias relacionadas con prominina, incluyendo diferentes variantes de empalme (Tabla 1).

Tabla 1. Tipos de Prominina

Grupo ortólogo	Especie (cromosoma)	Variante de empalme (nombre alternativo)
Prominina-1	humano (4p16.2-p12)	prominina-1.s1 (CD133.s1) prominina-1-.s2 (CD133-S2)
	ratón (5B3)	prominina-1.s1, prominina-1.s2 prominina-1.s3, prominina-1.s4 prominina-1.s5, prominina-1.s6 prominina-1.s7, prominina-1.s8
	rata (14q11)	prominina-1-s1
Prominina-2	humano (2q11.1)	prominina-2.s1
	ratón (2F1)	prominina-2.s1 prominina-2.s2
	rata (3q35)	prominina-2.s1

3.5.1 Prominina-1

Prominina-1 (CD133) es un marcador de superficie que fue originalmente descubierta en células troncales neuroepiteliales de ratón (Weigmann et al., 1997). En humanos fue identificada como un marcador antigénico expresado en células troncales hematopoyéticas y progenitoras referido como antígeno AC133 (Miraglia et al., 1997) (Yin et al., 1997). Una vez que se demostró que tanto la prominina de ratón como el antígeno AC133 humano muestran una distribución celular similar y una localización subcelular, se propuso que el antígeno AC133 se denominara “prominina-like 1” (PROML1) (Corbeil et al., 2000). Posteriormente se designó como “CD133”. Y se reportó que la proteína CD133 tiene un 60% de homología con la prominina-1 de ratón (Weigmann et al., 1997).

El cDNA de CD133 codifica un polipéptido de 865 (aa) aminoácidos con un tamaño aproximado de 97 kDaP (Miraglia et al., 1997). La estructura predicha consiste de un dominio extracelular de 85 aa N-terminal, cinco dominios transmembranal con dos grandes bucles extracelulares que contienen ocho sitios potenciales de glicosilación unidos a N y una cola citoplasmática de 50aa (Weigmann et al., 1997).

CD133 se ha usado principalmente para aislar poblaciones de CSCs con fenotipo de células troncales de múltiples tipos de cáncer de cerebro, sin embargo, también se ha investigado el uso de epítomos CD133 como marcadores para CSCs en otros tipos celulares como ependimomas (M. D. Taylor et al., 2005), cáncer de próstata (Collins et al., 2005), cáncer de colon (Eramo et al., 2008), cáncer de pulmón (Suetsugu et al., 2006), carcinoma hepatocelular (Ma, Lee, Zheng, Chan, & Guan, 2008), carcinoma laríngeo (Zhou, Wei, Cheng, Tian, & Jiang, 2007), melanoma (Monzani et al., 2007), cáncer de ovario (Ferrandina et al., 2008) y cáncer de páncreas (Hermann et al., 2007). En el 2003 Singh aisló una población de células con propiedades de CSC (mayor capacidad de proliferación, autorenovación y diferenciación) provenientes de tumores cerebrales humanos (Singh et al., 2003). Los estudios de seguimiento posteriores mostraron que esta subpoblación que expresa el epítomo CD133 tiene una capacidad dramáticamente aumentada para iniciar tumores en cerebro de ratón inmunodeficientes (Singh et al., 2004).

Se desconoce su función exacta, sin embargo, su localización transmembranal sugiere una posible participación en los mecanismos que influyen en la polaridad celular, la migración y la interacción de células troncales con las células vecinas y/o la matriz extracelular (M. Zhang et al., 2008); (Beier et al., 2008). En modelos *in vitro*

se observó que células CD133+ aisladas de hígado fetal y de sangre de cordón umbilical mostraron capacidad de diferenciación hacia células neuronales y células gliales, incluyendo astrocitos (Uchida et al., 2000) (Kania et al., 2005). Las células CD133+ de GBM son capaces de diferenciarse en diferentes linajes y tienen una alta capacidad de formar neuroesferas. Además las células CD133+ aisladas de GBM expresan niveles significativamente más altos de genes de células troncales neuronales, apoyando así el genotipo de CSC CD133+ y sugiriendo que similares vías de señalización pueden estar involucradas en células troncales neuronales normales y de cánceres cerebrales (Liu et al., 2006).

También se observó que las CSC CD133+ son resistentes a agentes quimioterapéuticos y a la radiación (Blazek, Foutch, & Maki, 2007; Facchino, Abdouh, & Bernier, 2011) debido a que expresan genes resistentes a fármacos como BCRP1 y MGMT (O6-metilguanina-DNA metiltransferasa) genes antiapoptóticos como FLIP, BCL-2 Y BCL-XL y altos niveles de mRNA de transportadores ABC (Liu et al., 2006)

Se ha propuesto que la coexpresión de nestina y CD133 se asocia con un mal pronóstico de gliomas malignos e incluso se observó una mejor correlación con el curso clínico que con la clasificación histológica (M. Zhang et al., 2008). Por otra lado, se ha demostrado que la coexpresión de CD133 y Ki 67 es un importante factor pronóstico en la progresión de la enfermedad y un mal resultado clínico (Pallini et al., 2008).

Wang y colaboradores demostraron que células CD133- aisladas de cerebro humano, tienen la capacidad de producir tumores en ratones y pueden originar

células CD133+ (Wang et al., 2008). Otro estudio reportó la presencia de poblaciones de células CD133- con propiedades semejantes a las GSC (Beier et al., 2007); (Ogden et al., 2008). Sin embargo, Singh y cols. reportaron que sólo las células CD133+ son tumorigénicas, y su expresión está asociada con un pobre pronóstico (Singh et al., 2004). Dado el complejo microambiente y otros factores que afectan en la expresión del epítipo CD133 *in vitro*, existen algunos informes contradictorios en la literatura con respecto a la presencia de las GSC CD133-. Estas discrepancias pueden también ser el resultado de diferencias experimentales o variaciones entre o dentro de los tumores cerebrales (Dimov et al., 2011).

Por otro lado, la variabilidad de citocinas, factores de crecimiento e indicadores de estrés oxidativo podrían alterar irreversiblemente el genotipo y fenotipo de las GSC, dando lugar a diferentes subpoblaciones similares a las células troncales. Algunos estudios indican que la expresión de CD133 puede ser regulada por hipoxia, así como por disfunción mitocondrial (genética y química). Por lo que, la expresión de CD133 entre las células de glioma podría reflejar una respuesta de estrés ambiental (Griguer et al., 2008).

3.6 Tratamiento del GBM

La terapia actual para el GBM incluye la cirugía citorreductora seguida de quimioterapia (temozolamida) y radioterapia de haz externo fraccionada, la mejoría en la supervivencia incrementa de 13.4-19 meses (Stupp et al., 2009); (Delgado-López & Corrales-García, 2016) (Feng, Sui, Wang, & Sun, 2017) con un intervalo libre de progresión de solo 6.9 meses (Stupp et al., 2005).

La resección quirúrgica es un gran problema debido a la naturaleza infiltrativa y difusa del GBM que impide la remoción completa de las células que infiltran el parénquima cerebral, por lo que se sugiere que las células malignas residuales invariablemente causan recidivas (Hou, Veeravagu, Hsu, & Tse, 2006), así como la presencia de CSC (Singh et al., 2004).

Después de la extirpación quirúrgica de la masa tumoral, la recidiva se manifiesta a 2-3 cm de la cavidad de la resección en más del 95% de los casos (Giese, 2003). Actualmente no se ha determinado si la recidiva se debe a la migración o infiltración de las CSCs o a la resección incompleta de las CSCs que se encuentran dentro del tumor (Persano, Rampazzo, Della Puppa, Pistollato, & Basso, 2011) (Nduom, Hadjipanayis, & Van Meir, 2012).

Otros fenómenos que pueden contribuir a la falla en la terapia estándar del GBM son la barrera hematoencefálica (BHE) y el concepto de “privilegio inmunológico” en el cerebro. A pesar de la creencia que la BHE impide el paso de moléculas y células en el parénquima cerebral (Bechmann, Galea, & Perry, 2007), se ha demostrado que células del sistema inmune (Bechmann et al., 2001) y anticuerpos (Poduslo et al., 2007) se infiltran en el SNC. Por otro lado, algunos estudios sugieren que la BHE representa una limitante en el tratamiento del GBM, ya que los fármacos y otras macromoléculas terapéuticas tienen una penetración extremadamente limitada en el SNC cuando se administran sistémicamente (Kanu et al., 2009)

Ante esta controversial problemática y debido a que la radioterapia y quimioterapia conllevan un considerable daño residual localizado y toxicidad sistémica. Se han explorado múltiples modos de terapia intratumoral para GBM, incluyendo la

instilación de quimioterapia, inducción de respuesta inmunológica, terapia génica, quimioterapia intersticial de obleas, administración de nanopartículas (Engelhard, 2000) (Sampson et al., 2011). Otra terapéutica que se encuentra en investigación son las terapias moleculares dirigidas, las cuales son típicamente inhibidores de moléculas pequeñas, dentro de estas se encuentran las toxinas blanco.

3.7 Inmunotoxinas

Basados en el concepto de “bala mágica”, se desarrollaron investigaciones en moléculas farmacológicamente activas ligadas a acarreadores contra blancos específicos. Diferentes moléculas acarreadoras o ligandos específicos han sido exploradas tales como: anticuerpos, factores de crecimiento, citocinas, hormonas, antígenos y lectinas. Y como agentes tóxicos: radioisótopos, toxinas, enzimas humanas (Y. M. Li & Hall, 2010).

Debido a que los anticuerpos son los ligandos más utilizados por su estabilidad en sangre, avidéz y afinidad por su antígeno diana (Polito, Djemil, & Bortolotti, 2016). Surge el termino inmunotoxinas también llamadas citotoxinas o toxinas blanco, y se definen como proteínas quiméricas o conjugados de un anticuerpo monoclonal (mAb) o fragmento de anticuerpo y toxina que se generan por fusión del anticuerpo con toxinas bacterianas o vegetales (Y. M. Li & Hall, 2010) (Pastan, Hassan, Fitzgerald, & Kreitman, 2006) (Bosch & Rosich, 2008), estas moléculas se unen específicamente a antígenos de superficie o receptores sobreexpresados en el cáncer, (Pastan et al., 2006). Dentro de los receptores más comúnmente

sobreexpresados está el receptor del EGF, receptor de transferrina (TfR), receptor de IL-13 o IL-14 P (Y. M. Li & Hall, 2010).

Se han utilizado toxinas bacterianas como vegetales. Las toxinas bacterianas más usados son la exotoxina de *Pseudomonas*, la toxina de Difteria y la toxina de ántrax (Potala, Sahoo, & Verma, 2008). Entre las toxinas vegetales usadas están las proteínas inhibidoras de ribosomas (RIPs): ricina, gelonina y saporina (Piascik, 1999) (Polito et al., 2016).

El uso de toxinas como fragmentos farmacológicamente activos de conjugados tiene algunas ventajas en comparación con fármacos, radioisótopo y enzimas: a diferencia de los fármacos que actúan sólo en células en división, las toxinas ejercen su acción de una manera catalítica, no inducen resistencia a los fármacos y son capaces de destruir células tanto en estado de división como en estado inactivo. Los radioisótopos tienen toxicidad inespecífica y dificultades con su estabilidad y manipulación. En comparación con las enzimas humanas, los conjugados con toxinas tiene más estabilidad y actividad contra las células blanco (Polito et al., 2016).

Un anticuerpo y la toxina se pueden conjugar mediante enlaces químicos o mediante ingeniería genética para obtener conjugados recombinantes (FitzGerald, Wayne, Kreitman, & Pastan, 2011). El ligando debe de cumplir con requisitos básicos como: no intervenir con la capacidad de unión del antígeno del portador, ser estable en el plasma, no liberar la toxina en el ambiente extracelular y liberar la toxina intacta en el compartimiento celular donde puede ejercer su actividad

enzimática. Con este fin un puente de disulfuro es el enlace químico más comúnmente utilizado ya que se presenta entre las subunidades tóxicas y lectinas de las toxinas. La presencia de enzimas tio-disulfuro oxidorreductasa en el lisosoma permiten romper enlaces y la posterior liberación de la carga útil toxica. Se obtiene un puente de disulfuro tras la reacción del anticuerpo y la toxina, previamente activados (adición de grupo sulfidriilo) usando reactivos heterobifuncionales que son capaces de inducir grupos reactivos con tiol en dos moléculas. Los reactivos heterobifuncionales más comúnmente utilizados, son 2-iminotiolano y succinimidil 3-(2-piridilditio) propionato. Estos reactivos se unen a grupos amino de las proteínas, formando enlaces amida o imino estables (Fracasso, Bellisola, Castelletti, Tridente, & Colombatti, 2004)

La eficacia de una inmunotoxina en la muerte celular depende de las propiedades específicas de la toxina, del portador y de las características de la célula diana, incluyendo la densidad del antígeno, afinidad de unión y transporte celular. Esta especificidad tiene como resultado menos efectos secundarios para las células no diana y una mayor citotoxicidad hacia los clones celulares resistentes a la quimioterapia y la radioterapia (Polito et al., 2016).

3.7.1 Inmunotoxinas en gliomas

A principios de 1970 se demostró que las inmunotoxinas eran potentes asesinos de células cancerosas, inicialmente se inyectaron toxinas no modificadas de forma tópica en metástasis de cánceres refractarios. En los tumores cerebrales las inmunotoxinas fueron relativamente resistentes al tratamiento debido a un menor

acceso a la inmunotoxina y un sistema inmunitario intacto (Frankel, Tagge, & Willingham, 1995) (Hall & Fodstad, 1992).

La eficacia de inmunotoxinas dirigidas contra líneas celulares de tumores del SNC se publicaron en 1987 (Zovickian, Johnson, & Youle, 1987), posteriormente se desarrollaron diferentes inmunotoxinas (Tabla 2). La inmunotoxina IL-4 (38-37)-PE38KDEL (CpIL-4 o NB-3001), formada por la unión de la IL-4 con una forma mutada de exotoxina de *Pseudomonas spp* (PE), fue diseñada contra el receptor IL-4 debido a que se encuentra sobreexpresado en gliomas malignos y tumores astrocíticos malignos, la importancia de la expresión de IL-4 en las células de glioma maligno aún no está clara, sin embargo, participa en la inhibición de la proliferación celular y la inducción de transducción de señales a través de la vía JAK/STAT (Pernis et al., 1995).

La inmunotoxina de fusión recombinante IL-13-PE38QQR, está compuesta de IL-13 y una forma mutada de PE, esta inmunotoxina mostró citotoxicidad en líneas celulares de glioma *in vitro*, actividad antitumoral significativa y regresión parcial de los GBM humanos (Kunwar, 2003) (Shimamura, Husain, & Puri, 2006).

La inmunotoxina TP-38 es una proteína recombinante formada por PE-38 con TGF- α que se dirige específicamente al receptor del EGF, ésta fue probada en pacientes con tumores cerebrales primarios o metastásicos recurrentes, sin embargo, la media de supervivencia fue de 31.9 semanas (Sampson et al., 2003).

La transferrina-CRM107 (Tf-CRM107) es una proteína conjugada de toxina difteria con mutación puntual (CRM107) unida por un enlace tioéster a Tf humano. Los

resultados con esta inmunotoxina mostraron una disminución del $\geq 50\%$ en el volumen de aumento del tumor tratado y el tiempo de supervivencia fue de 37 semanas (Y. M. Li & Hall, 2010).

Tabla 2. Inmunotoxinas para el tratamiento de gliomas

Inmunotoxina	Antígeno diana	Vía de administración	Fase clínica	Numero y tipo de tumor	Resultado	Efectos adversos
IL-4(38-37)-PE38KDEL	IL-4R	Intratumoral (CED)	I/II	31 (25GBM y 6 AA)	Media de supervivencia 8.2 meses; 6 meses de supervivencia fue 52%	Dolor de cabeza, convulsiones, debilidad, disfasia, hidrocefalia
IL-13-PE38QQR	IL-13R	Intratumoral (CED)	I/II/ III	Fase II, 51 (46 GBM, 3AA, 2 otros) Fase III, 296 GBM recurrente	Infusión CIMT 0.5 $\mu\text{g/ml}$, media de supervivencia 42.7 semanas para GBM en fase II, y 36.4 semanas in fase III	Dolor de cabeza, convulsiones, debilidad, embolia pulmonar
TP-38	TGF- α	Intratumoral (CED)	I	20 (17 GBM, 3 otros)	Media de supervivencia 28 semanas	Hemiparesia, fatiga, dolor de cabeza, disfasia
Tf-CRM107	Tf	Intratumoral (CED)	I/II	44 (GBM, AA)	Media de supervivencia 37 semanas	Convulsiones, edema cerebral

Se realizaron ensayos de fase I y II de IL-4 (38-37) en 6 pacientes que mostraron una respuesta parcial y un paciente mostró remisión completa, pero presentaron alto grado de citotoxicidad por lo que los estudios fueron abandonados (Rand et al., 2000). En contraste, ensayos de fase I y II en pacientes con GBM residual mostraron mejor respuesta al tratamiento con IL13-PE38QQR y TGF α -PE38 (Sampson et al., 2003). 2005; (Boskovitz et al., 2004; Sampson et al., 2005). A pesar de los diversos estudios con terapias dirigidas para el tratamiento del GBM aún no existen reportes que eliminen de manera eficaz las GCS.

Las inmunotoxinas a base de ricina son probablemente estudiadas con más frecuencia hasta la fecha. Los ensayos clínicos que usan conjugados de ricina, se enfocaron principalmente en neoplasias hematológicas malignas (Pastan et al., 2006); (Vallera & Myers, 1988). Posteriormente fue probado un MAb TfR conjugado a la cadena A de ricina (454A12-rRa) en líneas celulares y cultivos primarios de GBM y neuroblastoma mostrando una respuesta citotóxica (Martell, Agrawal, Ross, & Muraszko, 1993)

3.8 Anticuerpo IgY

En el desarrollo de terapias dirigidas contra el cáncer han sido utilizadas diferentes moléculas acarreadoras o ligandos específicos tales como: anticuerpos monoclonales (mABs), factores de crecimiento, citosinas, hormonas, antígenos y lectinas. Los anticuerpos son los ligandos más utilizados por su estabilidad en sangre, avidéz y afinidad (Polito et al., 2016). Sin embargo, los mABs son moléculas complejas que requieren técnicas extensas de obtención y purificación que conllevan costos de producción elevados y limita su uso ampliamente, además presentan bajas concentraciones que requieren la producción en grandes cantidades para lograr una eficacia clínica (Chames, Van Regenmortel, Weiss, & Baty, 2009), por lo que se ha considerado el uso de los anticuerpos policlonales, como la IgY.

La glucoproteína IgY fue identificada por primera vez por William (1962) como gamma-globulina en la yema de huevo (10-25 mg/ml) así como en sangre (5-6 mg/ml). En 1969 Leslie y Clem acuñaron el término "IgY" para referirse a anticuerpos de aves de corral, incluyendo los encontrados en la yema de huevo, y sugirió que

podría ser una fuente alternativa eficaz de inmunoglobulinas para usar como ingrediente alimentario. Patterson et al. (1962), Rose et al. (1974) y Bar- Joseph y Malkinson (1980) informaron que los anticuerpos IgY séricos de pollo inmunizados fueron transportados eficientemente en la yema de huevo. Según Polson et al. (1980) y Altschuh et al. (1984), se mantuvieron altos niveles de actividad de los anticuerpos en la vacuna durante varios meses mediante inmunización periódica (WILLIAMS, 1962).

IgY es el mayor anticuerpo sérico de anfibios, reptiles y aves, comparte similitud tanto con IgG como IgE de mamíferos (A. I. Taylor, Gould, Sutton, & Calvert, 2008). La región Fab (fragmento de unión al anticuerpo) de la IgY no contiene la región bisagra, dándole menos flexibilidad de unión al antígeno con una amplia gama de epítomos antigénicos (proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos). Comparada con la IgG de mamífero, la IgY de pollo tiene una afinidad de 3 a 5 veces más y reacciona más rápidamente a los mismos antígenos (Ikemori, Peralta, Kuroki, Yokoyama, & Kodama, 1993) (Lemamy et al., 1999) (Stuart, Pietrzyk, Furlanetto, & Green, 1988).

La proteína tiene un peso de 180,000 Da, la cual consiste de dos subunidades: una cadena pesada de 67,000-70,000 Da y una cadena ligera de 22,000-30,000 Da (Gassmann, Thömmes, Weiser, & Hübscher, 1990). La IgY es estable a pH 4-9 y hasta 65°C en estado acuoso. Sin embargo, la resistencia de IgY a rangos de pH más extremos aumenta en condiciones de alta salinidad o la estabilización con reactivos tales como sorbitol (Shimizu et al., 1992).

El uso de IgY como un nuevo modo de inmunoterapia usando inmunoglobulina de gallina oral para conferir inmunidad pasiva ha ganado interés como una alternativa

no antibiótica barata para la profilaxis y el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades infecciosas. IgY se ha utilizado en el tratamiento o prevención de caries dental, periodontitis y gingivitis, gastritis y úlcera gástrica, aftas orales y diarrea (Rahman, Van Nguyen, Icatlo, Umeda, & Kodama, 2013).

La IgY como inmunoterapia ha sido muy atractiva debido a que la posee varias ventajas, incluyendo: 1) falta de reactividad con el sistema del complemento humano y los receptores Fc humanos evitado así la inflamación no específica, 2) excluye el uso de compuestos tóxicos o aditivos para su preparación a partir de la yema de huevo, 3) los colesterolos y triglicéridos de huevo pueden ser controlados a niveles bajos y 4) IgY ejerce efectos benéficos antimicrobianos e inmunoestimulatorios en conjunto con otras proteínas del huevo (Rahman et al., 2013). Otra ventaja es que la inmunogenicidad de la IgY se incrementa contra las proteínas de mamíferos debido a la distancia filogenética entre los organismos, por lo que la producción de anticuerpos contra estas proteínas es más exitosas en pollos que en otros mamíferos, además, los anticuerpos IgY tienden a reconocer la misma proteína en varias especies de mamíferos, haciéndolos más ampliamente aplicables (Gassmann et al., 1990).

3.9 Proteínas inhibidoras de ribosomas (RIPs)

El estudio de las RIPs se produjo en 1970, cuando se informó un efecto tóxico *in vitro* de abrina y ricina para las células tumorales en comparación con células normales, surgiendo así la posibilidad de aplicarlas como tratamiento del cáncer (Lin, Tserng, Chen, Lin, & Tung, 1970).

Las RIPs son una clase de enzimas tóxicas, que eliminan específicamente el resto de adenina A4324 dentro de la secuencia GAGA en la región ricina/sarcina de ARN ribosomal 28S en la subunidad 60S. La eliminación de la adenina daña los ribosomas de una manera irreversible, causando la inhibición de proteínas PMID: 16799768. En modelos in vitro las RIP también tienen actividad sobre otros sustratos, tales como ADN, ARNm, ARNt y poli (A) (Bolognesi et al., 2002) (Barbieri et al., 2000) (Ferrerías, Citores, Iglesias, Jiménez, & Girbés, 2011).

Las RIPs se clasifican en tipo 1 que consisten en una proteína de una sola cadena con actividad enzimática, y tipo 2 que consiste en una cadena A enzimática unida a una cadena B (Barbieri et al., 2000). Dentro de las RIPs tipo 2 se encuentran la ricina y la abrina.

La abrina es una toxina aislada de semilla de la planta *Abrus precatorius* (Y. L. Chen, Chow, Tsugita, & Lin, 1992), es altamente tóxica con una dosis mortal humana estimada de 0.1-1 µg/kg (Chaturvedi et al., 2015). Esta proteína consta de dos subunidades unidas por un enlace disulfuro, la cadena A y B. La cadena B es una lectina específica de galactosa que facilita la unión de la abrina a la membrana celular y permite una rápida endocitosis de la toxina en la célula. La cadena A inactiva catalíticamente las subunidades ribosómicas 60S (Barbieri et al., 2000), inhibiendo la síntesis de proteínas por su actividad N-glicosidasa (Barbieri, Battelli, & Stirpe, 1993) (Barbieri et al., 2004) (Shih, Wu, Hung, Yang, & Lin, 2001). El enlace disulfuro se reduce en el retículo endoplásmico (RE) seguido por la translocación de la cadena A al citosol por la vía de degradación de las proteínas asociadas a RE (Deeks et al., 2002). Además de la inhibición de la síntesis de proteínas, se ha

demostrado que la abrina induce apoptosis (Narayanan, Surolia, & Karande, 2004) (Qu & Qing, 2004).

Es posible que la abrina induzca múltiples vías de señalización que resulten en la muerte celular y, por tanto, diferentes líneas celulares pueden responder de manera diferente con la abrina (Narayanan, Surendranath, Bora, Surolia, & Karande, 2005).

Una vía alterna de inducción de apoptosis por abrina fue propuesta por Shih et. al. Ellos encontraron que la apoptosis es independiente de su actividad glicosidasa y se debe a su interacción directa con una proteína mitocondrial llamada proteína-1 antioxidante (AOP-1). Demostraron que la abrina colocaliza con la AOP-1 en la mitocondria, además que la abrina era capaz de provocar una disminución de la función antioxidante de AOP-1 y, en consecuencia, un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), y la liberación de citocromo C en el citosol. Este estudio propuso que la actividad

apoptogénica de la cadena A de la abrina podría ser independiente de su actividad ARN-N-glicosidasa (Shih et al., 2001) (Narayanan et al., 2004).

La cadena A de la abrina se ha conjugado con anticuerpos monoclonales usando moléculas ligantes que contienen disulfuro. Existe interés considerable en el uso potencial de los conjugados o inmunotoxinas en la quimioterapia contra el cáncer (Y. L. Chen et al., 1992). El estudio realizado por Gadadhar y Karande demostraron efectividad de una inmunotoxina usando la cadena A recombinante de la abrina conjugada a anticuerpos monoclonales producidos contra el receptor de la hormona liberadora de gonadotropina humana (Gadadhar & Karande, 2013).

3.10 Expresión y producción de la proteína CD133

Estudios previos realizados en el laboratorio de neuroinmunología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía lograron producir la proteína CD133 de forma recombinante. La secuencia codificante del antígeno CD133 se obtuvo de forma comercial del epítipo AC133 (Bioclone Inc. Cat. RPV0119) que corresponde a los aminoácidos 73 a 95 de la región altamente inmunogénica de la proteína (CZEDTLRKFKQKAYESKIDYDKPET). El cDNA fue clonado en un vector de expresión de *E. coli* pET28a (Novagen Cat. No. 69337-3), el cual cuenta con una cola de seis histidinas en su extremo N-terminal y una secuencia que codifica para un gen de resistencia a kanamicina.

3.11 Producción de IgY anti CD133

Una vez que se logró la sobreexpresión de la proteína CD133 con IPTG, se procedió a realizar la inmunización de las gallinas. Se inmunizó una gallina (*Gallus gallus*, variedad Hy LineBrown) de 14 semanas de edad con el antígeno CD133 y otra más con PBS. Se administró 0.5 ml (200µg/ml) de antígeno CD133 por vía intramuscular en la región pectoral, posteriormente se aplicaron 3 refuerzos. Se realizó la recolección de los huevos a partir del día 38 para realizar la extracción de los anticuerpos IgY. El anticuerpo se aisló de la yema de huevos hiperinmunizados basándose en el método de Polson y cols. (1980, 1985).

3.12 Diseño y expresión de la cadena A de abrina

Se obtuvo la secuencia codificante para la cadena A de Abrina mediante bioinformática (GenBank: CAA54139.1) (EDRPIKFSTEGATSQSYKQFIEALRER LRGGLIHDIPVLPDPTTLQERNRYITVELSNSDTESEIEVGIDVTNAYVVAYRAGTQS YFLRDAPSSASDYLFTGTDQHSLPFYGTYGDLERWAHQSRQQIPLGLQALTHGIS FFRSGGNDNEEKARTLIVIIQMVAEAARFRYISNRVRSIQTGTAFQPDAAMISLEN NWDNLSRQGVQESVQDTPNQVTLTNIRNEPVIVDSLHPTVAVLALMLFVCNPP). El cDNA fue clonado en un vector de expresión de *E. coli* pET28a (Novagen Cat. No. 69337-3). Para la producción de la cadena A de Abrina se utilizó la cepa de *E. coli* denominada BL21DE3pLysS, (Novagen Cat. No. 69451-4).

4. JUSTIFICACIÓN

El estudio de la etiología y fisiopatología del GBM ha ayudado a comprender el comportamiento de este tumor, sin embargo, la gran heterogeneidad genética, fenotípica y celular contribuyen en la problemática del tratamiento.

En los últimos años la teoría de la CSC en el GBM ha representado una de las principales causas del origen, resistencia y recidiva de la enfermedad, debido a que esta subpoblación posee alta capacidad de tumorigénesis y gran resistencia a radioquimioterapia. Estas observaciones sugieren la importancia de las CSC en el desarrollo del GBM e implica que el tratamiento exitoso de este tumor sólo es posible cuando se eliminan las poblaciones de CSG.

Se han aplicado diversas terapias en el tratamiento del GBM, entre las que se encuentran: radioterapia, quimioterapia (temozolamida, carboplatino, vincristina y cloroquina) inmunoterapia (vacunas, anticuerpos, inmunotoxinas, radioinmunoconjugados), terapia génica (virus, vectores liposomales, nanopartículas) y campos eléctricos alternos, todas estas terapias se han dirigido contra diferentes blancos terapéuticos, sin embargo, estas no consideran la eliminación de CSG.

Basados en el concepto de terapias dirigidas, en este proyecto propusimos construir una inmunotoxina formada por un anticuerpo IgY anti-CD133 unida a la cadena A de la toxina abrina. Con el objetivo de eliminar selectivamente la subpoblación de CSG, dicha inmunotoxina se dirigió contra la proteína CD133 expresada en CSG, lo que podría en un futuro permitir el incremento en la sobrevida y mejorar la calidad de vida de los pacientes.

5. HIPÓTESIS

La inmunotoxina eliminará de forma selectiva células troncales carcinogénicas CD133+ de glioblastoma

6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la efectividad de la inmunotoxina *in vitro* en células troncales carcinogénicas CD133+ de glioblastoma.

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar el anticuerpo IgY específico anti CD133+.
- Unir mediante acoplamiento químico la cadena A de Abrina con IgY antiCD133+.
- Purificar células troncales carcinogénicas CD133+ de glioblastoma.
- Evaluar la citotoxicidad de la inmunotoxina en células troncales carcinogénicas CD133+ de glioblastoma.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizó el anticuerpo IgY específico anti CD133+, extraído de huevos de gallina inmunizadas previamente con la proteína obtenida de forma recombinante con CD133+ (Bioclone Inc. Cat. RPV0119) en la cepa de *E-coli* BL21DE3pLysS (Novagen Cat. No. 69451-4).

La cadena A de abrina, se obtuvo de lisados bacterianos de cepas *E-coli* BL21DE3pLysS (Novagen Cat. No. 69451-4) transformadas con el plásmido de la secuencia codificante para la cadena A de Abrina (GenBank: CAA54139.1).

8.1 Purificación del anticuerpo IgY anti CD133+

Los anticuerpos específicos IgY anti-CD133, fueron aislados mediante cromatografía de afinidad, utilizando columnas de sefarosa (Pierce NSH-Activated, Agarose Spin Columns, Thermo Scientific) acopladas a la proteína CD133. Posteriormente se recuperaron de la fracción de elución las inmunoglobulinas. La purificación se evaluó mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes con gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12 %.

1. Se hidrató la resina de agarosa NHS-activada con buffer de acoplamiento (0.1M fosfatos de sodio, 0.15M NaCl, pH 7.2). Se agregó 2 ml del buffer en 150 mg de resina de agarosa seca y se dejó hidratar durante 30 minutos.
2. La resina de agarosa NHS-activada se colocó en una columna de Thermo Scientific Pierce de Spin.
3. Se preparó la proteína CD133 con buffer de acoplamiento y se agregó a la columna, se dejó por 30 min. Se removió el exceso de proteína no acoplada a la resina mediante lavados con buffer y centrifugación 1000x g por 1 minuto.
4. Se bloquearon los sitios inespecíficos de la columna con buffer de amortiguación (10mM tris pH 7.5, 50 mM KCl y 20 mM EDTA) durante 20 minutos, se centrifuga a 1000x g durante 1 minuto y se lava la columna con buffer de acoplamiento.
5. Se equilibró la columna a temperatura ambiente.
6. Se agregó 1 ml de buffer de unión (TBS o PBS) y se removió centrifugando a 1000x por 2 minutos (se repitió este paso).

7. Se incubó la columna con la muestra de anticuerpos totales IgY, durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo se centrifugó a $1000 \times g$ durante 2 minutos.
8. Se lavó la columna con 3 ml de PBS y se centrifugó $1000 \times g$ durante 2 minutos. Se guardó cada una de las fracciones.
9. Se agregó 8 ml de buffer de elución (0.1-0.2M glicina•HCl, pH 2.5) y se fue recolectando 1 ml de fracción por tubo.

8.2 Purificación de la cadena A de abrina

Para la purificación de la cadena A de abrina se usaron columnas de afinidad HisPur™ Ni-NTA Purification Kit (Pierce Biotechnology IL 61105 USA Cat. No. 88229), siguiendo las indicaciones del proveedor.

1. Se lisaron cultivos bacterianos de cepa *E-coli* transformadas con el plásmido para la cadena A de Abrina, en buffer de lisis (PBS con $1.3 \mu\text{g/ml}$ de inhibidores de proteasas cocktail SIGMAFAST™, Sigma-Aldrich).
2. Se equilibró la columna de afinidad HisPur con 6 ml de buffer de equilibrio: 1ml PBS, 10mM (50 $\mu\text{l/ml}$) imidazol y agua. Y se centrifugó a 700g durante 2 min.
3. Se agregó el extracto de las proteínas a la columna y se incubó durante 30 min. Una vez transcurrido el tiempo se centrifugó a 700g durante 2 min.
4. Se lavó la columna tres veces con buffer de lavado: 1ml PBS, 25mM (50 $\mu\text{l/ml}$) imidazol y agua. Se centrifugó a 700g durante 2 min y se recolectaron las fracciones por separado.

5. Posteriormente se agregó el buffer de elución: 1ml PBS, 250mM (50 μ l/ml) imidazol y agua. Se centrifugó a 700g durante 2 min y se repitió este paso 2 veces más recolectando de igual forma las fracciones por separado.
6. Las fracciones obtenidas fueron analizadas mediante SDS-PAGE al 15%.

8.3 Western Blot

Mediante western blot se analizó la especificidad del anticuerpo purificado IgY para el reconocimiento de CD133, y para determinar la presencia de la cadena A de abrina. Se utilizaron proteínas extraídas de lisados bacterianos de E. coli que expresan CD133 y la cadena A de abrina.

1. Se tomaron 30 μ g/ml de proteínas y se le agregó buffer de carga 2X (Tris-HCl 100mM, pH 6.8, SDS 4%, azul de bromofenol 0.2%, glicerol 20% y β -mercaptoetanol 10%).
2. Las muestras se cargaron en geles SDS/PAGE al 12% y se corrieron por un periodo de entre 1 y 2 h a 120 V. Y se transfirieron por 2 h a 0.02 Amp.
3. Las membranas fueron bloqueadas con 2.5 gr de leche descremada en 50 ml de PBS, durante una hora.
4. Se lavaron las membranas 3 veces con PBS por 10 min cada lavado, una vez terminados los lavados se incubó con el anticuerpo primario en PBS (1:3000), durante una noche. Anti-histidina (Santa Cruz)
5. Se realizaron 3 lavados y se incubó con el anticuerpo secundario (anti-conejo 1:3000) durante 2 h

6. Las membranas fueron lavadas con PBS y reveladas por quimioluminiscencia con KitECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare, Amersham).

8.4 Formación de los conjugados

Para realizar el acoplamiento del anticuerpo IgY anti-CD133 con la abrina, se utilizó el reactivo SMPT (4-succinimidiloxycarbonil-metil- α -[2-piridilditio] tolueno, Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante y de acuerdo al protocolo descrito por Thorpe, cols. 1987 (Thorpe et al., 1987). El SMPT es un ligante heterobifuncional con dos grupos reactivos, un sulfidrilo y un grupo amino.

1. El anticuerpo IgY anti-CD133+ (1.6 mg/ml) previamente obtenido se incubó con SMPT (6 mM) disuelto en 5% de DMSO. Se eliminó el SMPT sobrante mediante diálisis, se colocó dentro de un casete de diálisis (Slide-A-Lyzer®, Thermo scientific) para ser dializado con PBS-EDTA (ácido etilendiaminotetra acético) durante 24 h en refrigeración.
2. La toxina abrina 1mg/ml en PBS se incubó con 2.5mM de ditioneitol (DTT) durante 1h a temperatura ambiente.
3. Posteriormente se agregó la toxina al anticuerpo activado con SMPT, se incubó durante 8 h en una cámara de nitrógeno a temperatura ambiente. El exceso de sitios activos piridil-disulfuro se bloquearon con 25 μ g/ml de cisteína durante 6 h.
4. Por último, el acoplado fue filtrado y analizado mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE al 12 %.

8.5 Cultivos celulares

Se usaron las células de glioma A-172, U373, LN-18 y U87 derivadas de GBM humano y C6 de GBM de rata, obtenidas de la American Tissue Culture Collection (ATCC). Éstas fueron cultivadas en condiciones estériles a 37°C en una atmósfera húmeda controlada con CO₂ al 5% en medio DMEM (Medio de Eagle modificado de Dulbecco, GIBCO BRL, GrandIsland, NY, USA) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (GIBCO, BRL), 4 mM de glutamina, 100 u/ml de penicilina, y 100 mg/ml de estreptomina.

Las GSC se obtuvieron mediante separación por perlas magnéticas, estas fueron cultivadas en esferoides, usando medio preparado de acuerdo al protocolo publicado por Guerrero-Cázares y cols. 2009. DMEM F-12 con 1% de penicilina/estreptomina, suplementado con B-27 (Miltenyi Biotec), 20 ng/ml de factor de crecimiento epidermal (EGF, Human EGF-Miltenyi Biotec®) y 20ng/ml de factor de crecimiento fibroblástico (FGF, Human FGF-2- Miltenyi Biotec®).

8.6 Separación de CSG

La línea celular C6 contiene una población heterogénea incluyendo GCS CD133+, por lo que se realizó la separación de esta subpoblación mediante columnas MACS (MACS Miltenyi biotec®) y perlas magnéticas CD133 MicroBead kit (MACS Miltenyi biotec®), siguiendo las indicaciones del proveedor y la metodología empleada por Otvos y cols (Otvos et al., 2016).

1. Se incubaron 1×10^7 células de C6 con 100 μ l PBS estéril y 10 μ l de anticuerpo IgY anti CD133 durante 30 min a TA. Se lavó con 1 ml de PBS estéril y se centrifugó 300xg por 5 min.
2. El pellet se resuspendió en 100 μ l de buffer desgasificado (PBS estéril pH 7.2, 0.5% BSA, 2 mM EDTA para diluir el reactivo autoMACS™ Rinsing Solution en relación 1:20), y 10 μ l de anticuerpo conjugado a FITC (CD133 MicroBead kit, Miltenyi Biotech), se incubó durante 10 min a 4°C en la oscuridad, posteriormente se lavó con 2 ml de buffer desgasificado y se centrifugó 300xg por 10 min.
3. Se resuspendió el pellet en 500 μ l de buffer desgasificado y la columna es acondicionada con 500 μ l del mismo buffer. Se colocó la mezcla de las células en la columna previamente montada en la base con un magneto.
4. Se dejó que pasaran las células no CSG y se realizaron 3 lavados con medio DMEM-F12 con 1% de penicilina/estreptomicina.
5. Se retiró la columna del magneto y las CSG fueron extraídas de la columna usando medio DMEM-F12 con 1% de penicilina/estreptomicina, EGF (20 ng/ml) y FGF (20ng/ml). Por último, las CSG fueron cultivadas usando dicho medio.

8.7 Determinación de la expresión de CD133+

Para determinar el porcentaje de expresión de CD133+ de células troncales recuperadas por separación con perlas magnéticas, las células se tiñeron con anticuerpo anti-CD133 y se analizaron mediante citometría de flujo.

1. 500,000 GSC de cultivos de esferoides y C6, se incubaron con 200 μ l de dilución de anticuerpo CD133/2-APC human Miltenyi Biotec-PBS (1:1000) por 30 min en la oscuridad.
2. Posteriormente las células se lavaron con 1 ml de PBS, se centrifugaron a 300 xg por 5min. y se fijaron con paraformaldehído (PFA) 1%.
3. El porcentaje de CD133+ se determinó mediante citometría de flujo (FACSCalibur instrument BD Biosciences), evaluando 10,000 eventos. Los datos se analizaron utilizando el programa Cell QuestPro and Flow Jo ver. 7.6.1. el software CellQuest (Becton Dickinson, San José, CA, USA)

8.8 Evaluación de la citotoxicidad por cristal violeta

Se evaluó la actividad de la toxina abrina y el anticuerpo IgY en las líneas celulares A-172, LN-18, U373, C6, VERO y fibroblastos mediante un ensayo con cristal violeta. Las células se trataron con el anticuerpo IgY a la concentración de 34 μ g/ml y con la abrina a dosis decrecientes a partir de 34 a 0.34 34 μ g/ml.

1. Se sembraron 10,000 células de las diferentes líneas celulares en placas de 96 pozos una vez que alcanzaron el 80% de confluencia, se trataron por triplicados con la inmunoglobulina IgY y la abrina por separado, a las concentraciones ya mencionadas y se incubaron 24 h a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂.
2. Posteriormente se retiró el tratamiento y las células se lavaron con PBS, se fijaron con PFA 1% durante 15 min y se eliminó el PFA.
3. Se adicionó 100 μ l de cristal violeta (1% en PBS) e incubó durante 25 min a temperatura ambiente. Se eliminó el colorante y se lavó con PBS.

4. Posteriormente se colocó 200 μ l de ácido acético 10% por 5 min y se analizaron en un lector de Elisa a 570 nm.

8.8.1 Ensayo de MTT

Para determinar el efecto de la inmunotoxina, abrina e IgY sobre GSC, se utilizó la prueba de MTT (3-[4,5dimethylthiazol-2-yl]- 2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich). El MTT es una sal amarilla que es reducida por células metabólicamente activas con ayuda del succinato deshidrogenasa para generar formazán de color púrpura.

1. En cajas de 96 pozos fueron sembradas 10,000 células por pozo y tratadas con la inmunotoxina, IgY y abrina a la concentración de 34 μ g/ml. Se incubaron durante 24, 48 y 72 h.
2. Posteriormente se adicionó el reactivo MTT a una concentración de 0.5 mg/ml por pozo. Después de 4 h de incubación, se agregaron 100 μ l de buffer de solubilización (0.04 N de Hcl en isopropanol) y se incubaron durante 12 h a 37°C.
3. Por último, se cuantificó el formazán utilizando un lector de ELISA (Microelisa®Minireader MR590 A Dynatech Product) a una longitud de onda de 540 nm.

8.9 Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de análisis de varianza ANOVA de un factor seguida de Tukey usando el paquete estadístico SPSS ver 15 (Inc. Chicago IL.). Las diferencias se considerarán como estadísticamente significativas si tienen un valor de $p < 0.05$.

9. RESULTADOS

9.1 Purificación de la cadena A de abrina

Se realizó la purificación de la cadena A de abrina mediante columnas de afinidad. Las fracciones obtenidas de los lavados y las eluciones, así como el lisado total de las proteínas obtenidas de cultivos bacterianos sobreexpresados con IPTG, fueron analizados mediante electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE 12%. En el lisado total se observó la sobreexpresión de una banda de 31 kDa que corresponde a la cadena A de abrina, y en las fracciones correspondientes a las eluciones se muestra la purificación de la proteína (Fig. 1A). Para corroborar la presencia de la proteína abrina se realizó western blot, en donde se corrieron las proteínas totales de los lisados bacterianos, se realizó la transferencia y la membrana se incubó con anticuerpo anti-histidinas (Santa Cruz). Los resultados mostraron la expresión y el reconocimiento de una banda de 31 kDa que corresponde a la proteína A de abrina (Fig. 1B).

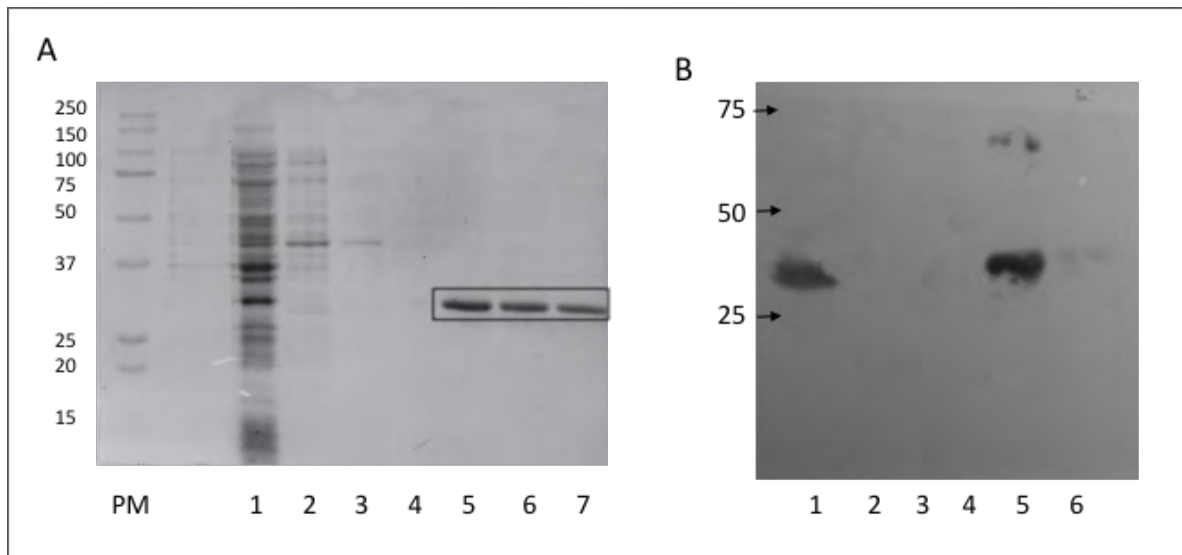


Figura 1. Purificación de la cadena A de abrina. **A)** Electroforesis en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE 12%, muestra los productos del proceso de purificación de abrina inducida con IPTG: carril 1; proteínas del lisado bacteriano total, carril 2; proteínas no adheridas a la columna de afinidad, 3 y 4; lavados, carril 5; proteínas 1º elución, carril 6; proteínas 2º elución y carril 7; proteínas 3º elución. **B)** Wb de la abrina: 1 proteínas del lisado bacteriano total, 2; proteínas no adheridas a la columna de afinidad, 3 y 4; lavados, 5; proteínas 1º elución y 6; proteínas 3º elución. PM: peso molecular.

8.2 Purificación del anticuerpo IgY anti CD133+

La purificación de la proteína CD133 se realizó mediante cromatografía por afinidad HisPur™ Ni-NTA Purification Kit y se analizó en un gel SDS-PAGE 15%. En el gel se observó una sola banda en un peso aproximado de 18 kDa (Fig. 2A).

Los anticuerpos policlonales específicos IgY anti-CD133 obtenidos mediante cromatografía de afinidad se analizaron por electroforesis en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE al 12 %, se puede observar en el gel dos bandas correspondientes a la cadena pesada (55-77 kDa) y ligera (23-26kDa) de la inmunoglobulina IgY (Fig. 2B). La especificidad del anticuerpo se observó mediante WB, la figura 2C mostró que los anticuerpos policlonales IgY anti CD133 obtenidos de las yemas de las gallinas inmunizadas reconocieron a la proteína CD133 (banda

de 18 kD). Por otro lado, las membranas que fueron incubadas con anticuerpos IgY no específicos para la proteína CD133, reconocieron otras proteínas que no son de interés.

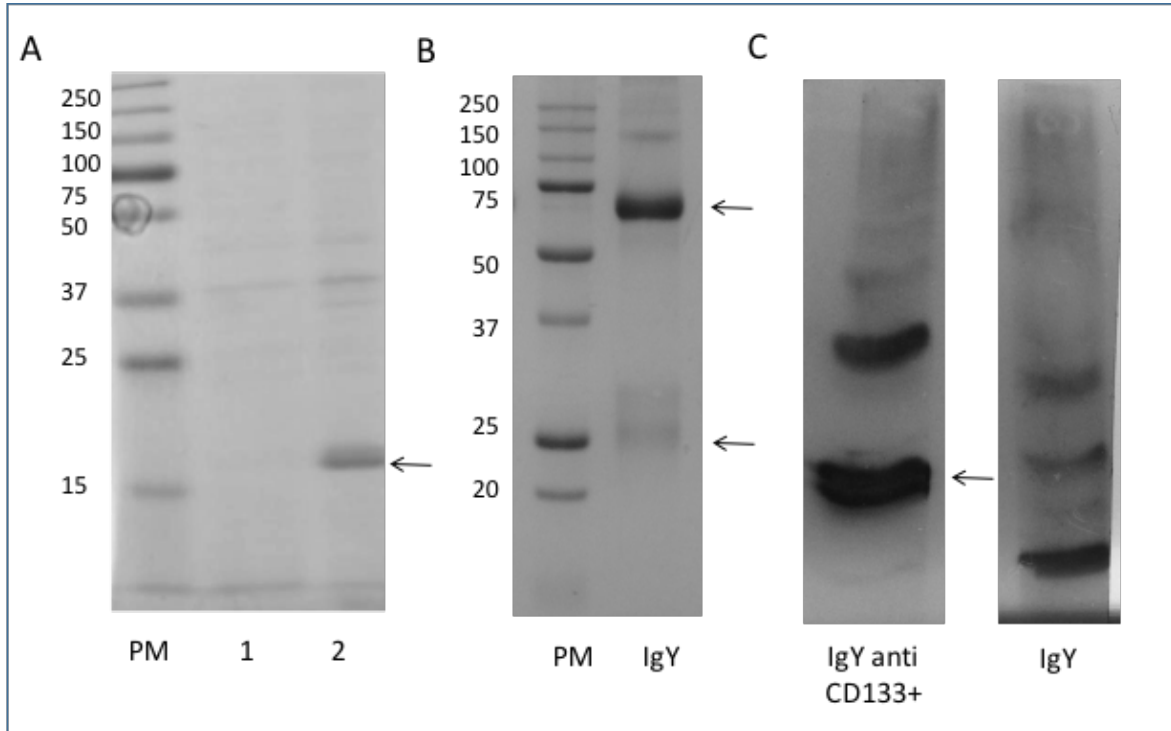


Figura 2. Purificación de IgY CD133+. **A)** Gel SDS-PAGE 15% en el cual se muestran los productos de las eluciones de la proteína CD133+, en el carril 2 se observa la proteína purificada (flecha). **B)** Electroforesis en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE 12%, muestra la purificación de los anticuerpos IgY CD133+, cadena pesada (55-77 kDa) y ligera (23-26 kDa) de la inmunoglobulina IgY (flechas). **C)** WB del lisado bacteriano que expresa la proteína CD133. La flecha muestra una banda de 18kD que corresponde a la proteína reconocida por el IgY anti-CD133+, el segundo film fue incubado con anticuerpo IgY no CD133. PM: peso molecular.

8.3 Formación del conjugado IgY anti-CD133 con la abrina

Se analizó el acoplamiento del anticuerpo IgY anti-CD133 con la abrina, fue analizado mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE al 12 %. Se observó en el gel una disminución en la intensidad de la cadena pesada de la IgY (banda 50-70 kDa, carril dos), así como una banda de aproximadamente

150 kDa correspondiente al acoplamiento de la toxina abrina con la cadena pesada de la IgY (ultimo carril Fig. 3).

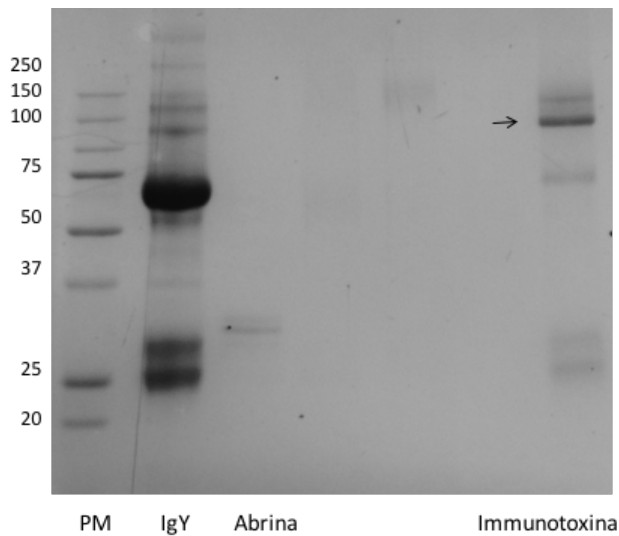


Figura 3. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE 12%. El carril corresponde al anticuerpo IgY CD133+, el carril tres a la abrina (31 kDa) y en el último carril se observa una banda de aproximadamente 150 kDa que corresponde al acoplamiento de la inmunotoxina (flecha negra).

8.4 Efecto de IgY, abrina y de la inmunotoxina en GBM

La citotoxicidad de la abrina se determinó mediante la técnica de cristal violeta. Las líneas celulares A-172, LN-18, U373, C6, fibroblastos y VERO, se trataron con la abrina a dosis decrecientes a partir de 34 a 0.34 mg/ml e incubadas 24 h. Los resultados mostraron actividad tóxica de la abrina, específicamente en las líneas celulares A-172 y VERO que en el resto de líneas de GBM, así mismo se observó un porcentaje mayor de muerte celular a la dosis de 34 mg/ml (Fig. 3A), con una disminución de la viabilidad de hasta el 27% en A-172 y 28% en VERO.

Por otro lado, estas líneas celulares de GBM, VERO y fibroblastos humanos fueron tratadas con el anticuerpo IgY a la concentración de 34 mg/ml durante 24h, y se observó que el tratamiento con el anticuerpo no indujo disminución en el porcentaje de viabilidad celular en las diversas líneas celulares evaluadas (fig. 3B).

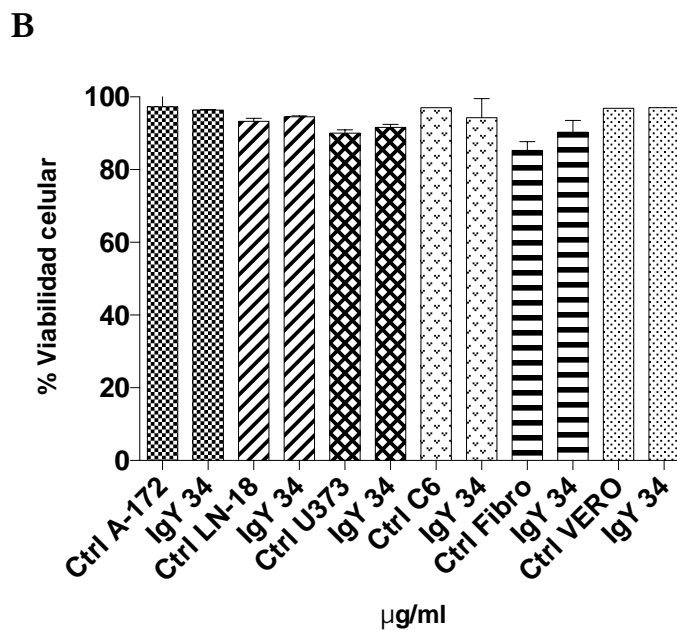
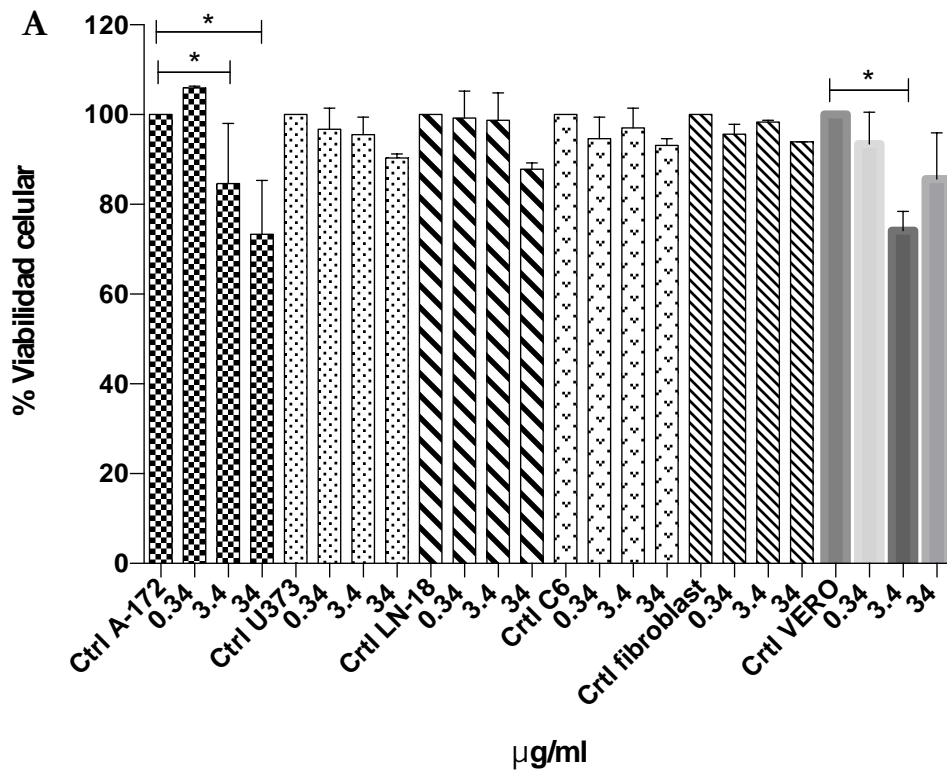


Figura 3. A) Evaluación de citotoxicidad de IgY en las líneas celulares de GBM (A-172, U373, LN-18 y C6) y en líneas celulares de fibroblastos y VERO. Los cultivos celulares fueron tratados con la inmunoglobulina IgY por 24 h. La gráfica no muestra diferencias significativas con respecto al control. **B)** Evaluación de citotoxicidad por cristal violeta de la abrina en las líneas celulares de GBM, en donde se observó disminución significativa de la viabilidad celular solo en la línea A-172. Prueba ANOVA de un factor seguida de Tukey, * $p < 0.05$ vs control.

Posteriormente se realizó la purificación de las células troncales carcinogénicas de la línea celular C6 mediante perlas magnéticas. Una vez que las células fueron recuperadas de la columna, se cultivaron en medio DMEM-F12 suplementado con B-27, FGF y EGF. Los resultados de la observación por microscopía de luz, mostraron la presencia de células con morfología redonda y la formación de esferoides (fig. 4).

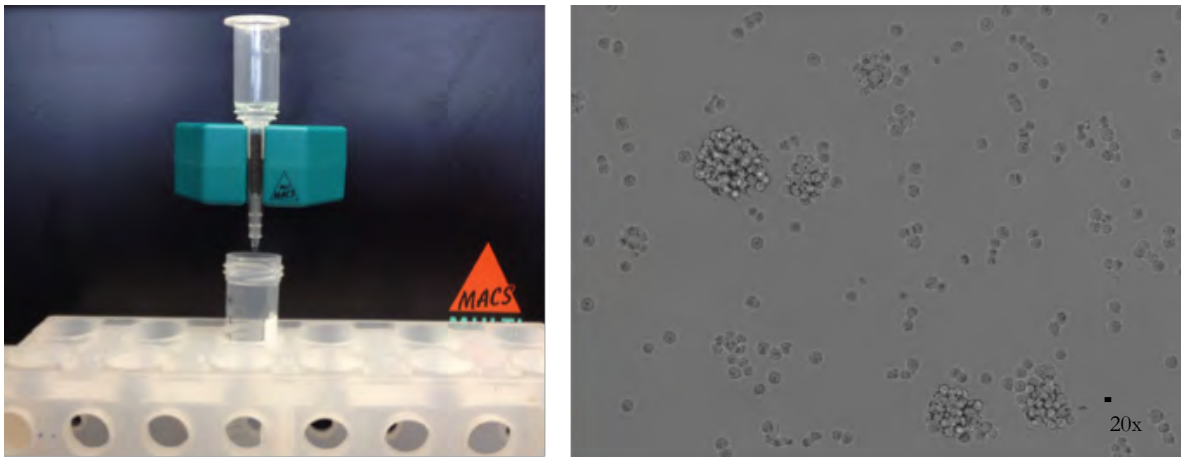


Figura 4. Separación de GSC con perlas magnéticas MicroBead kit (MACS Miltenyi biotec®) y cultivos de células troncales carcinogénicas de glioblastoma.

Se determinó el porcentaje de expresión de la proteína CD133 mediante citometría de flujo de C6 y cultivos de esferoides. Se observó un porcentaje de expresión en la línea celular C6 de 10% y de 30.75% en la GSC cultivadas como esferoides (fig. 5).

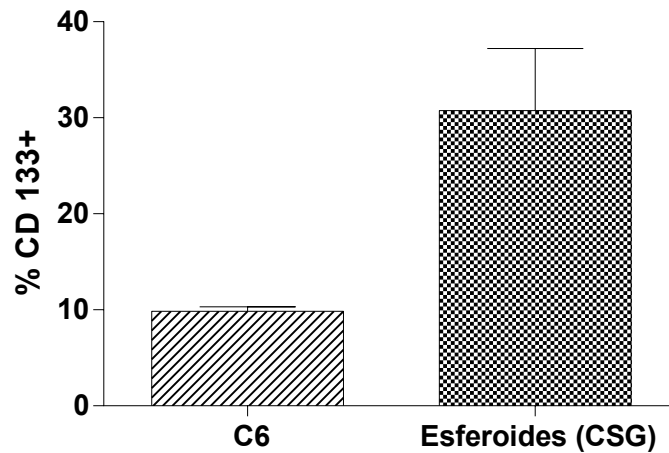
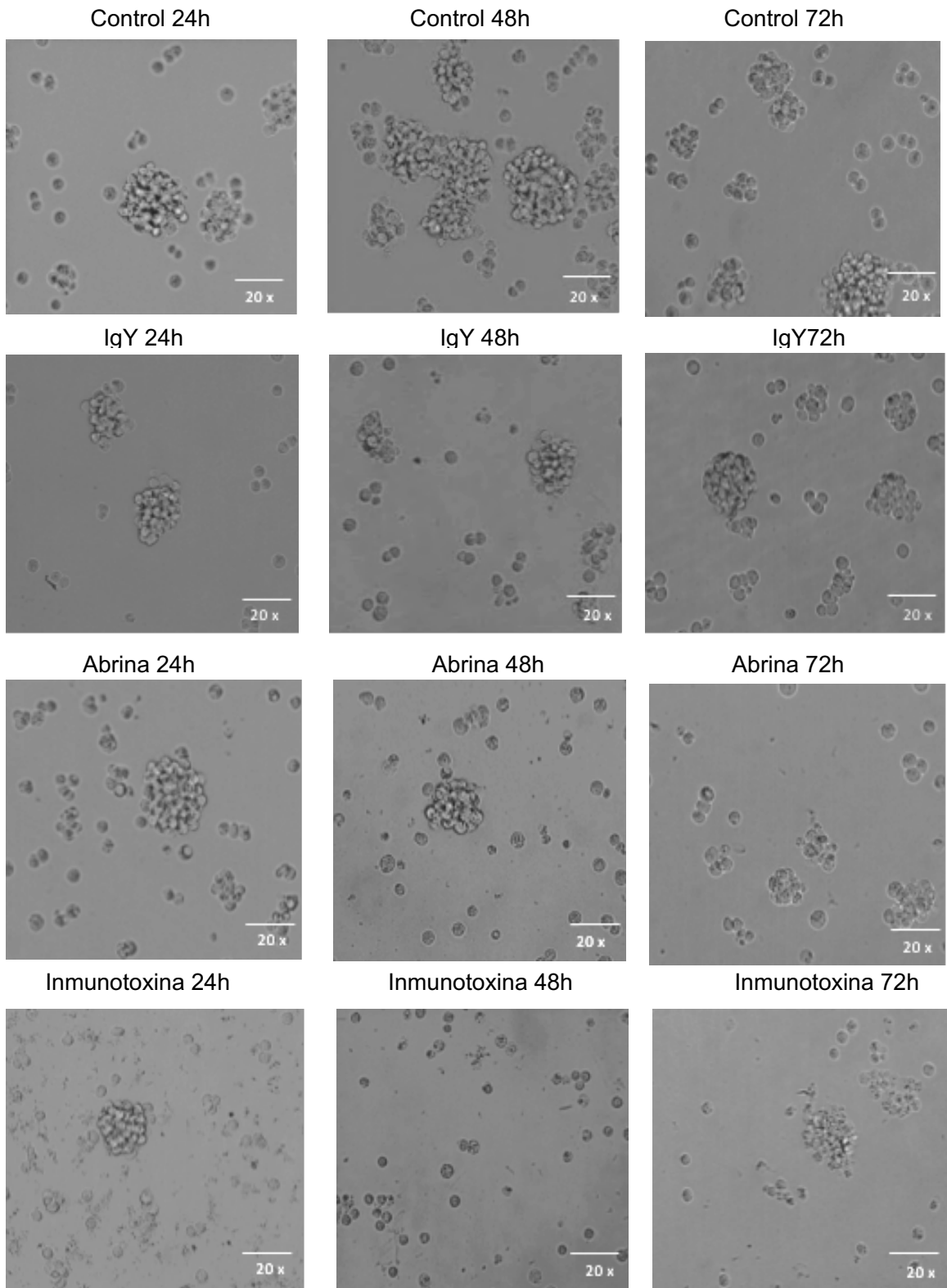


Figura 5. Expresión de CD133 en GSC mediante citometría de flujo

En placas de 96 pozos se sembraron 1×10^4 CSC de GBM en cada pozo, posteriormente se colocó el tratamiento con la abrina, IgY CD133+ y con la inmunotoxina y se determinó la viabilidad celular mediante ensayos de MTT. El tratamiento con la inmunotoxina a las 24 h redujo la viabilidad celular 51% con respecto al control, el efecto se mantuvo a las 48 y 72 h con una disminución de la viabilidad de 33% y 55% respectivamente. Por otro lado, los resultados también mostraron daño celular en los tratamientos con la abrina, sin embargo, se observó mayor daño en los tratados con la inmunotoxina (fig. 6A). El tratamiento con el anticuerpo IgY no induce toxicidad celular a los distintos tiempos mostrando un porcentaje de viabilidad celular de alrededor del 90%; mientras que el tratamiento con la abrina redujo la viabilidad celular 33% con respecto al control a las 24 h, sin embargo, a tiempos posteriores no mostró citotoxicidad (fig. 6B).

A



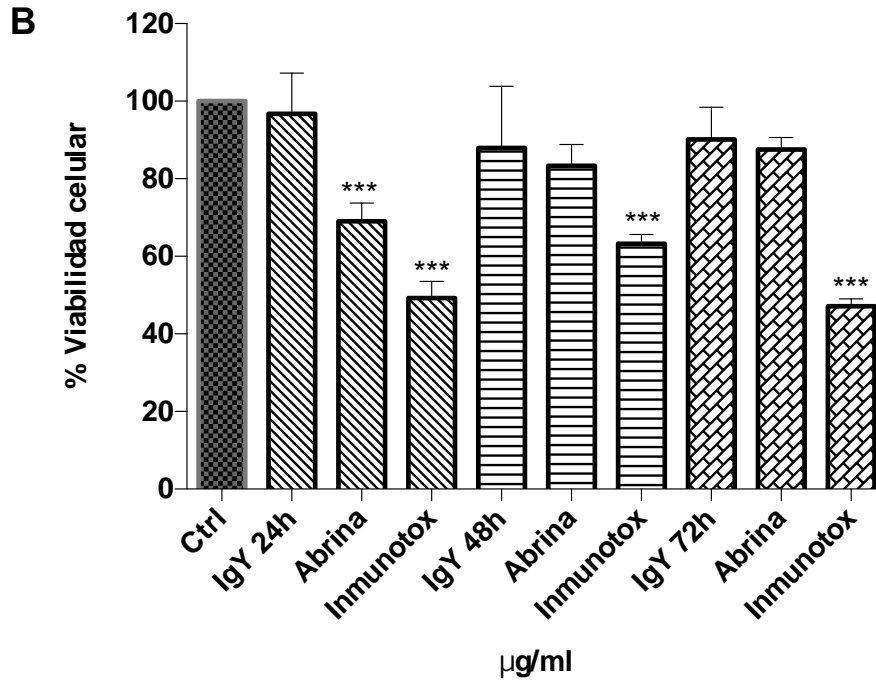


Figura 6. Cultivos de células troncales carcinogénicas de C6 tratadas con la cadena A de abrina, el anticuerpo IgY CD133+ y la inmunotoxina. A) Las imágenes de microscopía muestran una disminución en el número de células y en la formación de esferoides, así como daño celular en el tratamiento con la inmunotoxina a las 48 y 72h, en el caso de la abrina solo se observaron cambios a las 72 h y con el anticuerpo no mostro diferencias significativas. **B)** Evaluación de viabilidad celular por MTT. En la gráfica se observa una disminución de la viabilidad celular a partir de las 24 h hasta las 72 de hasta un 55% en el tratamiento con la inmunotoxina.

10. DISCUSIÓN

El GBM es uno de los tumores cerebrales más frecuentes del SNC. La supervivencia de los pacientes es pobre debido a que es un tumor heterogéneo, difuso y altamente infiltrante. A pesar de los múltiples tratamientos actualmente disponibles, la recidiva es alta.

La participación de las GSCs en la gliomagénesis (Kong et al., 2013) y la regresión del GBM continúa siendo ampliamente estudiada, así como el desarrollo de alternativas terapéuticas para la eliminación de las GSCs, que ha sido complicado por la fuerte resistencia a la radioterapia y quimioterapia de estas células (Liu et al., 2006) (Dean, 2005) (S. Bao et al., 2006; Dean et al., 2005). Con la finalidad de eliminar de manera selectiva esta subpoblación diseñamos una inmunotoxina con la toxina abrina y la inmunoglobulina IgY.

En los últimos años la biotecnología se ha implementado en el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer con el objetivo de crear agentes con alta afinidad y especificidad. Los anticuerpos por ser un componente vital del sistema inmune adaptativo de los vertebrados, y debido a su habilidad para reconocer múltiples agentes ájenos o anormales han sido usados en el desarrollo de terapias dirigidas (Kennedy, Oliveira, Granja, & Sarmiento, 2017), como en el caso de las inmunotoxinas.

Las inmunotoxinas son consideradas agentes potentes por ser selectivas y por su capacidad citotóxica. Éstas se han aplicado en diversas neoplasias malignas, incluyendo el glioblastoma (Y. Zhang et al., 2015). Específicamente, en el tratamiento del GBM la producción de inmunotoxinas se ha dirigido contra diversos blancos terapéuticos tales como: receptor de transferrina (Tf-CRM 107, conjugado de transferrina humana (Tf) y la toxina difteria (Weaver & Laske, 2003), receptor de IL-13 (PE38QQR o Cintredekin besudotox, diseñada con IL-13 y exotoxina de *Pseudomonas*) (Debinski, Obiri, Powers, Pastan, & Puri, 1995), receptor de IL-4 (IL4-PE4E, IL-4(38-37)-PE38KDEL, fue creada usando IL-4 exotoxina de *Pseudomonas* mutada) (Puri et al., 1996), y EGFR (TP38, fusión de una fragmento único variable del anticuerpo monoclonal D2C7 con la exotoxina *Pseudomonas*) (X. Bao, Pastan, Bigner, & Chandramohan, 2016). Estos estudios reportaron que las inmunotoxinas mostraron una respuesta citotóxica en pacientes con tumores cerebrales malignos refractarios al tratamiento convencional, sin toxicidad sistémica ni neurológica grave (Weaver & Laske, 2003) (Laske, Ilercil, Akbasak, Youle, & Oldfield, 1994). Sin embargo, no existe una terapéutica contra las GSCs y se ha reportado que muestran fuerte resistencia a diversos agentes quimioterapéuticos como temozolamida, VP16, carboplatino y taxol (Liu et al., 2006).

Por lo que en el presente proyecto diseñamos una inmunotoxina contra GSCs, utilizando CD133 como antígeno para la generación de anticuerpos IgY, ya que este epítipo se ha expresado como un marcador tumoral en la identificación de la subpoblación de GSCs (Fatoo, Nanaszko et al. 2011). Y debido a que las GSCs que expresan la proteína CD133 han sido fuertemente asociadas con la capacidad

de autorenovación y capacidad de iniciar tumor (Singh et al., 2004), propusimos la proteína CD133 como posible blanco terapéutico. Para la expresión de la proteína CD133 y de la cadena A de abrina se utilizó la cepa de *Escherichia coli* BL21DE3, debido a su alto rendimiento, eficacia y por ser un cultivo económico.

Logramos producir y purificar un anticuerpo IgY anti-CD133. Los resultados mostraron dos bandas, de 25 y 70 kDa, que corresponden a la cadena ligera y pesada de la IgY respectivamente. Además, se observaron otras proteínas en el gel SDS-PAGE que podrían corresponder a productos de escisión de vitelogeninas (Klimentzou et al., 2006; Mann & Mann, 2008), sin embargo, se ha reportado que estas proteínas no interfieren con la inmunoglobulina IgY. Realizamos ensayos de citotoxicidad mediante cristal violeta y confirmamos que la inmunoglobulina no es tóxica en las diversas líneas celulares de GBM humano y de rata, sugiriendo que la unión del anticuerpo IgY anti-CD133 a su receptor no activa vías de muerte celular. Por otro lado, corroboramos por WB que la IgY anti-CD133 purificada tiene la capacidad de reconocer específicamente a la proteína CD133.

De igual manera diseñamos, produjimos y purificamos la cadena A de la toxina abrina. Analizamos la sobreexpresión de la cadena A de abrina con IPTG por SDS-PAGE y observamos una banda de 18 kDa correspondiente a la abrina. La purificación de ésta fue eficiente usando columnas de afinidad Ni-NTA, ya que nuestra proteína cuenta con una cola de histidinas que le permite unirse al Ni. Por otro lado, el WB incubado con el anticuerpo anti-histidinas mostró la expresión de la banda de 18 KDa confirmando así la presencia y purificación de la cadena A de abrina. El uso de la abrina en diferentes estudios ha ido incrementando en los

últimos años debido a la alta toxicidad a bajas concentraciones (0.2–10 µg/kg) (Fredriksson et al., 2015). En nuestro estudio probamos la actividad de la cadena A de abrina en diferentes líneas celulares de GBM humano y de rata y observamos una disminución en la viabilidad celular de la línea A-172, sugiriendo que esta línea celular posee mayor capacidad de endocitosis de la cadena A de abrina que el resto de las líneas de GMB usadas.

La construcción de la inmunotoxina se realizó mediante el acoplamiento de la cadena A de la toxina abrina con el anticuerpo IgY selectivo contra la proteína CD133. En el estudio realizado por Thorpe y colaboradores usaron la cadena A de la abrina en la construcción de una inmunotoxina y mostraron efectos antitumorales en un modelo animal de linfoma (Thorpe et al., 1987). Otros estudios reportaron que la abrina inhibe la síntesis de proteínas (Barbieri et al., 1993; Barbieri et al., 2004), e induce muerte celular (Narayanan et al., 2004) (Narayanan et al., 2005), específicamente se observó apoptosis en cultivos celulares de HeLa y células Jurkat (Narayanan et al., 2004) (Qu & Qing, 2004). El tratamiento con nuestra inmunotoxina IgY CD133-abrina mostró un incremento del porcentaje de muerte celular hasta un 55% en cultivos de GSCs.

El porcentaje de GSCs en líneas celulares ha sido controversial. La línea mejor estudiada es la línea C6 y se reportó valores de 0.4 a 30% (Shen et al., 2008; Zheng, Shen, Yang, & Liu, 2007), estas variaciones podrían atribuirse a los diferentes métodos de aislamiento, condiciones de cultivo celular, o marcadores de células madre, nuestros cultivos celulares de C6 expresaron un 10% de CD133. A pesar que la expresión de la proteína CD133 varía en GSCs por los niveles de oxígeno

(Bidlingmaier, Zhu, & Liu, 2008), nuestros cultivos de esferoides de GSCs expresaron 30.75% de CD133.

Las inmunotoxinas pueden usarse contra tumores sólidos y no sólidos pero tienen una mejor respuesta frente a los segundos, ya que resulta complicado pasar a través del tejido tumoral, además existen otras dificultades que podrían impedir alcanzar una mejor eficacia, tal como la inmunogenicidad, toxicidad en tejidos sanos y la inestabilidad de la molécula. Sin embargo, se han desarrollado alternativas para superar estas dificultades, incluyendo el uso de inmunosupresores, la reducción del tamaño de la molécula, y la humanización de ciertos componentes (Wolf & Elsässer-Beile, 2009). El efecto de nuestra toxina se encuentra restringido, debido a que no cuenta con la cadena B de la abrina, la cual es una lectina específica de galactosa que facilita la entrada a las células, y al estar unida químicamente mediante el entrecruzador SMPT a la IgY, permite reconocer únicamente a las células CD133+. Por lo que nuestros resultados sugieren que la inmunotoxina es significativamente efectiva en la eliminación de GSCs CD133+.

11. CONCLUSIÓN

Actualmente no existe una terapia efectiva contra las GSCs, el constante estudio de esta subpoblación ha mostrado que poseen diversas características que le confieren la capacidad de evadir la respuesta inmune, activación de mecanismos anti-apoptóticos, supervivencia, autorrenovación y por tanto resistencia a las terapias.

La eliminación de esta subpoblación se ha convertido en un problema en el tratamiento del GBM. El uso y desarrollo de inmunotoxinas contra blancos específicos podría producir un gran progreso en las terapias oncológicas. La inmunotoxina que producimos mostró efectividad citotóxica, por lo que, podría ser considerada como tratamiento contra GSCs CD133+.

Dado que la producción de inmunoglobulinas IgY es una técnica biotecnológica sencilla y de bajo costo por su fácil extracción a partir de la yema del huevo, podría ser considerada y usada como una terapia específica en el tratamiento de diversas patologías. El desarrollo y uso de esta inmunotoxina se encuentra sometida bajo patente nacional (MX/a/2015/44554).

12. ANEXO

11.1 Ensayo *in vivo*

Se realizó un primer ensayo *in vivo* con el objetivo de evaluar la inmunotoxina. Para el implante subcutáneo de células GSCs provenientes de la línea celular C6 (GBM de rata) se utilizaron ratones machos nude (nu/nu) de seis semanas de edad, que fueron alimentados *ad libitum* con dieta de roedores estéril y agua, se mantuvieron en microaisladores a una temperatura regulada (25 ± 2 °C) y humedad (40-50% aproximadamente).

11.1.1 Modelo de implantación subcutánea

El implante se realizó siguiendo el modelo propuesto por Yin Zhu y cols. (Zhu et al., 2017). Se inocularon 1×10^6 células de GSCs resuspendidas en 100 μ l de medio de cultivo DMEM-F12, el implante se colocó de forma subcutánea en el lomo de los ratones.

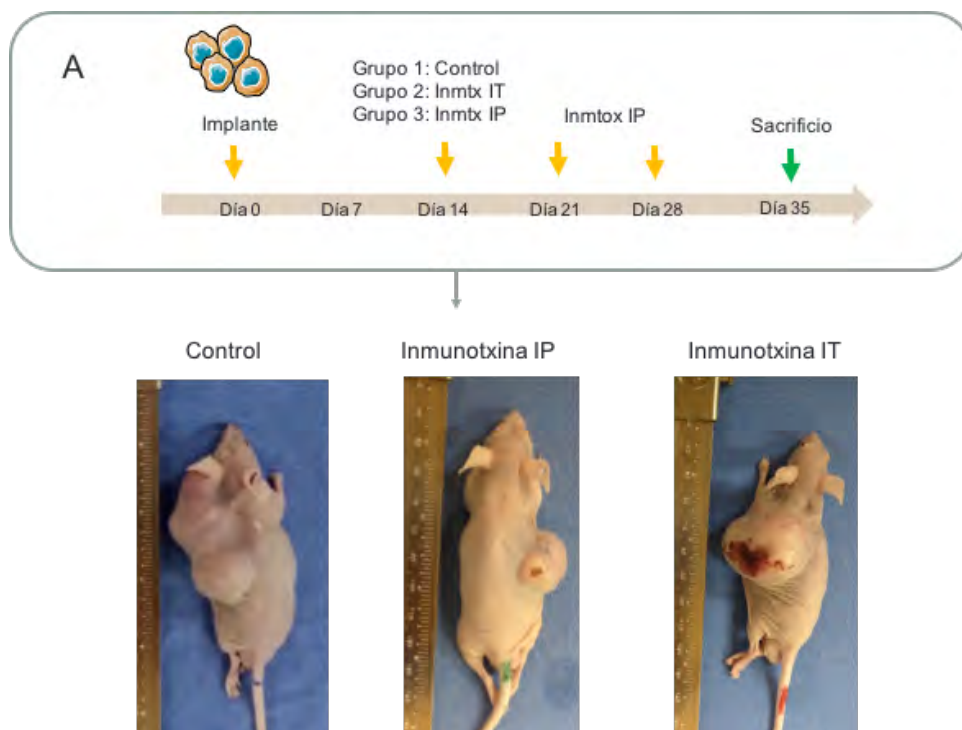
11.3 Tratamiento con la inmunotoxina

Posterior al implante (15 días), los animales fueron divididos en tres grupos de 6 ratones y de acuerdo al tratamiento: grupo 1 ratones sin tratamiento (control), grupo 2 ratones tratados con la inmunotoxina IgY-abrina (1.34 μ g/Kg) aplicada vía intratumoral (IT), y grupo 3 ratones tratados con la inmunotoxina (1.34 μ g/Kg) aplicada vía intraperitoneal (IP). Se administró una sola dosis IT y 3 dosis intraperitoneal, los tumores fueron medidos con un vernier a partir del día 14, 21, 28 y al día 35 fueron medidos y sacrificados.

11.4 Resultados preliminares

Los resultados mostraron que los cultivos de GSCs purificadas de la línea celular C6 con perlas magnéticas, posee la capacidad de generar tumores en los ratones nude. En el grupo control se observó un mayor volumen tumoral con respecto a los grupos tratados (fig.7 A).

Los grupos tratados mostraron una tendencia favorable en la reducción del volumen tumoral. El grupo tratado con la inmunotoxina IP tuvo una mayor reducción con respecto a los tratados vía IT (fig. 7 B). En ambos grupos se observa un patrón de crecimiento semejante, sugiriendo que la inmunotoxina podría tener un efecto en la inhibición del crecimiento, sin embargo, se requiere realizar más estudios que permitan conocer el mecanismo de acción de la inmunotoxina, así como incrementar el número de población.



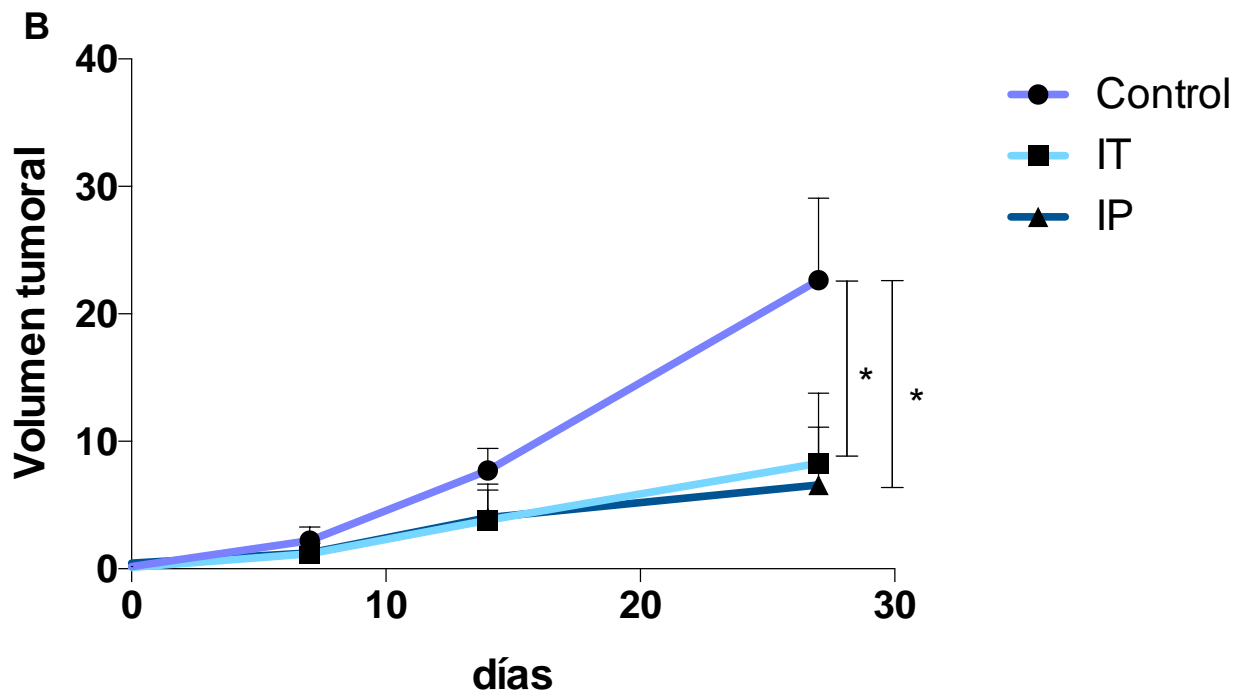


Figura 7. Modelo *In vivo* en ratones nude. A) Implante subcutáneo de células GSC y protocolo del tratamiento con la inmunotoxina. B) Evaluación del volumen tumoral del grupo control y los tratados IP e IT, en el grafico se observa una disminución del volumen tumoral en los tratados con la inmunotoxina.

13. PRODUCTOS DE LA INVESTIGACIÓN

- Roxana Magaña-Maldonado, **Elda Georgina Chávez-Cortez**, Nora Karen Olascoaga-Arellano, Mariana López-Mejía, Fernando Manuel Maldonado-Leal, Julio Sotelo, and Benjamín Pineda. *Immunological Evasion in Glioblastoma. BioMed Research International*. Vol 2016, Article ID 7487313.
- Presentación cartel
 - o 2nd World Congress on NeuroTherapeutics: Dilemmas. Debates, Discussion. Prague, Czech Republic. September 3-6, 2015.
- Presentación oral
 - o XXXI Reunión Anual de Investigación. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” (2016).
- Distinciones
 - o Segundo Lugar en la modalidad Básica de la XXXI Reunión Anual de Investigación. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”.

14. REFERENCIAS

- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(7), 3983-3988. doi:10.1073/pnas.0530291100
- ALTMAN, J. (1963). Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat Rec*, *145*, 573-591.
- Altman, J., & Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*, *124*(3), 319-335.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R. E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A. B., . . . Rich, J. N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, *444*(7120), 756-760. doi:10.1038/nature05236
- Bao, X., Pastan, I., Bigner, D. D., & Chandramohan, V. (2016). EGFR/EGFRvIII-targeted immunotoxin therapy for the treatment of glioblastomas via convection-enhanced delivery. *Receptors Clin Investig*, *3*(4). doi:10.14800/rci.1430
- Barbieri, L., Battelli, M. G., & Stirpe, F. (1993). Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochim Biophys Acta*, *1154*(3-4), 237-282.
- Barbieri, L., Bolognesi, A., Valbonesi, P., Polito, L., Olivieri, F., & Stirpe, F. (2000). Polynucleotide: adenosine glycosidase activity of immunotoxins containing ribosome-inactivating proteins. *J Drug Target*, *8*(5), 281-288. doi:10.3109/10611860008997906
- Barbieri, L., Ciani, M., Girbés, T., Liu, W. Y., Van Damme, E. J., Peumans, W. J., & Stirpe, F. (2004). Enzymatic activity of toxic and non-toxic type 2 ribosome-inactivating proteins. *FEBS Lett*, *563*(1-3), 219-222. doi:10.1016/S0014-5793(04)00286-8
- Bechmann, I., Galea, I., & Perry, V. H. (2007). What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol*, *28*(1), 5-11. doi:10.1016/j.it.2006.11.007
- Bechmann, I., Priller, J., Kovac, A., Böntert, M., Wehner, T., Klett, F. F., . . . Nitsch, R. (2001). Immune surveillance of mouse brain perivascular spaces by blood-borne macrophages. *Eur J Neurosci*, *14*(10), 1651-1658.
- Beier, D., Hau, P., Proescholdt, M., Lohmeier, A., Wischhusen, J., Oefner, P. J., . . . Beier, C. P. (2007). CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res*, *67*(9), 4010-4015. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4180
- Beier, D., Wischhusen, J., Dietmaier, W., Hau, P., Proescholdt, M., Brawanski, A., . . . Beier, C. P. (2008). CD133 expression and cancer stem cells predict prognosis in high-grade oligodendroglial tumors. *Brain Pathol*, *18*(3), 370-377. doi:10.1111/j.1750-3639.2008.00130.x
- Bergmann, A., Tugentman, M., Shilo, B. Z., & Steller, H. (2002). Regulation of cell number by MAPK-dependent control of apoptosis: a mechanism for trophic survival signaling. *Dev Cell*, *2*(2), 159-170.
- Bhatia, M. (2001). AC133 expression in human stem cells. *Leukemia*, *15*(11), 1685-1688.
- Bidlingmaier, S., Zhu, X., & Liu, B. (2008). The utility and limitations of glycosylated human CD133 epitopes in defining cancer stem cells. *J Mol Med (Berl)*, *86*(9), 1025-1032. doi:10.1007/s00109-008-0357-8
- Blazek, E. R., Foutch, J. L., & Maki, G. (2007). Daoy medulloblastoma cells that express CD133 are radioresistant relative to CD133- cells, and the CD133+ sector is enlarged by hypoxia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, *67*(1), 1-5. doi:10.1016/j.ijrobp.2006.09.037

- Bolognesi, A., Polito, L., Lubelli, C., Barbieri, L., Parente, A., & Stirpe, F. (2002). Ribosome-inactivating and adenine polynucleotide glycosylase activities in *Mirabilis jalapa* L. tissues. *J Biol Chem*, *277*(16), 13709-13716. doi:10.1074/jbc.M111514200
- Bonnet, D., & Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, *3*(7), 730-737.
- Bosch, F., & Rosich, L. (2008). The contributions of Paul Ehrlich to pharmacology: a tribute on the occasion of the centenary of his Nobel Prize. *Pharmacology*, *82*(3), 171-179. doi:10.1159/000149583
- Boskovitz, A., Wikstrand, C. J., Kuan, C. T., Zalutsky, M. R., Reardon, D. A., & Bigner, D. D. (2004). Monoclonal antibodies for brain tumour treatment. *Expert Opin Biol Ther*, *4*(9), 1453-1471. doi:10.1517/14712598.4.9.1453
- Bralten, L. B., & French, P. J. (2011). Genetic alterations in glioma. *Cancers (Basel)*, *3*(1), 1129-1140. doi:10.3390/cancers3011129
- Chaichana, K., Parker, S., Olivi, A., & Quiñones-Hinojosa, A. (2010). A proposed classification system that projects outcomes based on preoperative variables for adult patients with glioblastoma multiforme. *J Neurosurg*, *112*(5), 997-1004. doi:10.3171/2009.9.JNS09805
- Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E., & Baty, D. (2009). Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br J Pharmacol*, *157*(2), 220-233. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00190.x
- Chaturvedi, K., Jadhav, S. E., Bhutia, Y. D., Kumar, O., Kaul, R. K., & Shrivastava, N. (2015). Purification and dose-dependent toxicity study of abrin in swiss albino male mice. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, *61*(5), 36-44.
- Chen, R., Smith-Cohn, M., Cohen, A. L., & Colman, H. (2017). Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance. *Neurotherapeutics*, *14*(2), 284-297. doi:10.1007/s13311-017-0519-x
- Chen, Y. L., Chow, L. P., Tsugita, A., & Lin, J. Y. (1992). The complete primary structure of abrin-a B chain. *FEBS Lett*, *309*(2), 115-118.
- Cho, D. Y., Lin, S. Z., Yang, W. K., Lee, H. C., Hsu, D. M., Lin, H. L., . . . Ho, L. H. (2013). Targeting cancer stem cells for treatment of glioblastoma multiforme. *Cell Transplant*, *22*(4), 731-739. doi:10.3727/096368912X655136
- Clarke, M. F., Dick, J. E., Dirks, P. B., Eaves, C. J., Jamieson, C. H., Jones, D. L., . . . Wahl, G. M. (2006). Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*, *66*(19), 9339-9344. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3126
- Collins, A. T., Berry, P. A., Hyde, C., Stower, M. J., & Maitland, N. J. (2005). Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*, *65*(23), 10946-10951. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2018
- Corbeil, D., Röper, K., Fargeas, C. A., Joester, A., & Huttner, W. B. (2001). Prominin: a story of cholesterol, plasma membrane protrusions and human pathology. *Traffic*, *2*(2), 82-91.
- Corbeil, D., Röper, K., Hellwig, A., Tavian, M., Miraglia, S., Watt, S. M., . . . Huttner, W. B. (2000). The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *J Biol Chem*, *275*(8), 5512-5520.
- Daga, A., Bottino, C., Castriconi, R., Gangemi, R., & Ferrini, S. (2011). New perspectives in glioma immunotherapy. *Curr Pharm Des*, *17*(23), 2439-2467.
- Dai, C., & Holland, E. C. (2003). Astrocyte differentiation states and glioma formation. *Cancer J*, *9*(2), 72-81.
- Dean, M. (2005). Cancer stem cells: Implications for cancer causation and therapy resistance. *Discov Med*, *5*(27), 278-282.
- Dean, M., Fojo, T., & Bates, S. (2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer*, *5*(4), 275-284. doi:10.1038/nrc1590

- Debinski, W., Obiri, N. I., Powers, S. K., Pastan, I., & Puri, R. K. (1995). Human glioma cells overexpress receptors for interleukin 13 and are extremely sensitive to a novel chimeric protein composed of interleukin 13 and pseudomonas exotoxin. *Clin Cancer Res*, *1*(11), 1253-1258.
- Deeks, E. D., Cook, J. P., Day, P. J., Smith, D. C., Roberts, L. M., & Lord, J. M. (2002). The low lysine content of ricin A chain reduces the risk of proteolytic degradation after translocation from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Biochemistry*, *41*(10), 3405-3413.
- Delgado-López, P. D., & Corrales-García, E. M. (2016). Survival in glioblastoma: a review on the impact of treatment modalities. *Clin Transl Oncol*, *18*(11), 1062-1071. doi:10.1007/s12094-016-1497-x
- Dimov, I., Tasić-Dimov, D., Conić, I., & Stefanovic, V. (2011). Glioblastoma multiforme stem cells. *ScientificWorldJournal*, *11*, 930-958. doi:10.1100/tsw.2011.42
- Dirks, P. B. (2008). Brain tumor stem cells: bringing order to the chaos of brain cancer. *J Clin Oncol*, *26*(17), 2916-2924. doi:10.1200/JCO.2008.17.6792
- Engelhard, H. H. (2000). The role of interstitial BCNU chemotherapy in the treatment of malignant glioma. *Surg Neurol*, *53*(5), 458-464.
- Eramo, A., Lotti, F., Sette, G., Pilozi, E., Biffoni, M., Di Virgilio, A., . . . De Maria, R. (2008). Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ*, *15*(3), 504-514. doi:10.1038/sj.cdd.4402283
- Facchino, S., Abdouh, M., & Bernier, G. (2011). Brain cancer stem cells: current status on glioblastoma multiforme. *Cancers (Basel)*, *3*(2), 1777-1797. doi:10.3390/cancers3021777
- Farrell, C. J., & Plotkin, S. R. (2007). Genetic causes of brain tumors: neurofibromatosis, tuberous sclerosis, von Hippel-Lindau, and other syndromes. *Neurol Clin*, *25*(4), 925-946, viii. doi:10.1016/j.ncl.2007.07.008
- Feng, E., Sui, C., Wang, T., & Sun, G. (2017). Temozolomide with or without Radiotherapy in Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme: A Meta-Analysis. *Eur Neurol*, *77*(3-4), 201-210. doi:10.1159/000455842
- Ferrandina, G., Bonanno, G., Pierelli, L., Perillo, A., Procoli, A., Mariotti, A., . . . Scambia, G. (2008). Expression of CD133-1 and CD133-2 in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*, *18*(3), 506-514. doi:10.1111/j.1525-1438.2007.01056.x
- Ferreras, J. M., Citores, L., Iglesias, R., Jiménez, P., & Girbés, T. (2011). Use of ribosome-inactivating proteins from Sambucus for the construction of immunotoxins and conjugates for cancer therapy. *Toxins (Basel)*, *3*(5), 420-441. doi:10.3390/toxins3050420
- Field, E. J., & Shenton, B. K. (1975). Inhibitory effect of unsaturated fatty acids on lymphocyte-antigen interaction with special reference to multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*, *52*(2), 121-136.
- Fisher, J. L., Schwartzbaum, J. A., Wrensch, M., & Wiemels, J. L. (2007). Epidemiology of brain tumors. *Neurol Clin*, *25*(4), 867-890, vii. doi:10.1016/j.ncl.2007.07.002
- FitzGerald, D. J., Wayne, A. S., Kreitman, R. J., & Pastan, I. (2011). Treatment of hematologic malignancies with immunotoxins and antibody-drug conjugates. *Cancer Res*, *71*(20), 6300-6309. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1374
- Fracasso, G., Bellisola, G., Castelletti, D., Tridente, G., & Colombatti, M. (2004). Immunotoxins and other conjugates: preparation and general characteristics. *Mini Rev Med Chem*, *4*(5), 545-562.
- Frankel, A. E., Tagge, E. P., & Willingham, M. C. (1995). Clinical trials of targeted toxins. *Semin Cancer Biol*, *6*(5), 307-317. doi:10.1006/scbi.1995.0039
- Frederick, L., Wang, X. Y., Eley, G., & James, C. D. (2000). Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res*, *60*(5), 1383-1387.

- Fredriksson, S., Artursson, E., Bergström, T., Östin, A., Nilsson, C., & Åstot, C. (2015). Identification of RIP-II toxins by affinity enrichment, enzymatic digestion and LC-MS. *Anal Chem*, *87*(2), 967-974. doi:10.1021/ac5032918
- Gadadhar, S., & Karande, A. A. (2013). Abrin immunotoxin: targeted cytotoxicity and intracellular trafficking pathway. *PLoS One*, *8*(3), e58304. doi:10.1371/journal.pone.0058304
- Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De Vitis, S., . . . Vescovi, A. (2004). Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res*, *64*(19), 7011-7021. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1364
- Gassmann, M., Thömmes, P., Weiser, T., & Hübscher, U. (1990). Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB J*, *4*(8), 2528-2532.
- Gibbs, C. P., Kukekov, V. G., Reith, J. D., Tchigrinova, O., Suslov, O. N., Scott, E. W., . . . Steindler, D. A. (2005). Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. *Neoplasia*, *7*(11), 967-976.
- Giese, A. (2003). Glioma invasion--pattern of dissemination by mechanisms of invasion and surgical intervention, pattern of gene expression and its regulatory control by tumorsuppressor p53 and proto-oncogene ETS-1. *Acta Neurochir Suppl*, *88*, 153-162.
- Gilbert, C. A., & Ross, A. H. (2009). Cancer stem cells: cell culture, markers, and targets for new therapies. *J Cell Biochem*, *108*(5), 1031-1038. doi:10.1002/jcb.22350
- Griguer, C. E., Oliva, C. R., Gobin, E., Marcorelles, P., Benos, D. J., Lancaster, J. R., & Gillespie, G. Y. (2008). CD133 is a marker of bioenergetic stress in human glioma. *PLoS One*, *3*(11), e3655. doi:10.1371/journal.pone.0003655
- Gürsel, D. B., Shin, B. J., Burkhardt, J. K., Kesavabhotla, K., Schlaff, C. D., & Boockvar, J. A. (2011). Glioblastoma stem-like cells-biology and therapeutic implications. *Cancers (Basel)*, *3*(2), 2655-2666. doi:10.3390/cancers3022655
- Hall, W. A., & Fodstad, O. (1992). Immunotoxins and central nervous system neoplasia. *J Neurosurg*, *76*(1), 1-12. doi:10.3171/jns.1992.76.1.0001
- Hambardzumyan, D., Squatrito, M., Squatro, M., & Holland, E. C. (2006). Radiation resistance and stem-like cells in brain tumors. *Cancer Cell*, *10*(6), 454-456. doi:10.1016/j.ccr.2006.11.008
- Hermann, P. C., Huber, S. L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J. W., Guba, M., . . . Heeschen, C. (2007). Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*, *1*(3), 313-323. doi:10.1016/j.stem.2007.06.002
- Hou, L. C., Veeravagu, A., Hsu, A. R., & Tse, V. C. (2006). Recurrent glioblastoma multiforme: a review of natural history and management options. *Neurosurg Focus*, *20*(4), E5.
- Ikemori, Y., Peralta, R. C., Kuroki, M., Yokoyama, H., & Kodama, Y. (1993). Research note: avidity of chicken yolk antibodies to enterotoxigenic Escherichia coli fimbriae. *Poult Sci*, *72*(12), 2361-2365.
- Kania, G., Corbeil, D., Fuchs, J., Tarasov, K. V., Blyszczuk, P., Huttner, W. B., . . . Wobus, A. M. (2005). Somatic stem cell marker prominin-1/CD133 is expressed in embryonic stem cell-derived progenitors. *Stem Cells*, *23*(6), 791-804. doi:10.1634/stemcells.2004-0232
- Kanu, O. O., Mehta, A., Di, C., Lin, N., Bortoff, K., Bigner, D. D., . . . Adamson, D. C. (2009). Glioblastoma multiforme: a review of therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets*, *13*(6), 701-718. doi:10.1517/14728220902942348
- Kennedy, P. J., Oliveira, C., Granja, P. L., & Sarmiento, B. (2017). Monoclonal antibodies: technologies for early discovery and engineering. *Crit Rev Biotechnol*, 1-15. doi:10.1080/07388551.2017.1357002
- Kleihues, P., & Ohgaki, H. (1999). Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol*, *1*(1), 44-51.

- Klimentzou, P., Paravatou-Petsotas, M., Zikos, C., Beck, A., Skopeliti, M., Czarnecki, J., . . . Evangelatos, G. P. (2006). Development and immunochemical evaluation of antibodies Y for the poorly immunogenic polypeptide prothymosin alpha. *Peptides*, *27*(1), 183-193. doi:10.1016/j.peptides.2005.07.002
- Kong, B. H., Park, N. R., Shim, J. K., Kim, B. K., Shin, H. J., Lee, J. H., . . . Lang, F. F. (2013). Isolation of glioma cancer stem cells in relation to histological grades in glioma specimens. *Childs Nerv Syst*, *29*(2), 217-229. doi:10.1007/s00381-012-1964-9
- Kunwar, S. (2003). Convection enhanced delivery of IL13-PE38QQR for treatment of recurrent malignant glioma: presentation of interim findings from ongoing phase 1 studies. *Acta Neurochir Suppl*, *88*, 105-111.
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., . . . Dick, J. E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, *367*(6464), 645-648. doi:10.1038/367645a0
- Laske, D. W., Illece, O., Akbasak, A., Youle, R. J., & Oldfield, E. H. (1994). Efficacy of direct intratumoral therapy with targeted protein toxins for solid human gliomas in nude mice. *J Neurosurg*, *80*(3), 520-526. doi:10.3171/jns.1994.80.3.0520
- Lemamy, G. J., Roger, P., Mani, J. C., Robert, M., Rochefort, H., & Brouillet, J. P. (1999). High-affinity antibodies from hen's-egg yolks against human mannose-6-phosphate/insulin-like growth-factor-II receptor (M6P/IGFII-R): characterization and potential use in clinical cancer studies. *Int J Cancer*, *80*(6), 896-902.
- Li, C., Heidt, D. G., Dalerba, P., Burant, C. F., Zhang, L., Adsay, V., . . . Simeone, D. M. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*, *67*(3), 1030-1037. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2030
- Li, Y. M., & Hall, W. A. (2010). Targeted toxins in brain tumor therapy. *Toxins (Basel)*, *2*(11), 2645-2662. doi:10.3390/toxins2112645
- Lin, J. Y., Tserng, K. Y., Chen, C. C., Lin, L. T., & Tung, T. C. (1970). Abrin and ricin: new anti-tumour substances. *Nature*, *227*(5255), 292-293.
- Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., Ng, H., Abdulkadir, I. R., . . . Yu, J. S. (2006). Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer*, *5*, 67. doi:10.1186/1476-4598-5-67
- Lokker, N. A., Sullivan, C. M., Hollenbach, S. J., Israel, M. A., & Giese, N. A. (2002). Platelet-derived growth factor (PDGF) autocrine signaling regulates survival and mitogenic pathways in glioblastoma cells: evidence that the novel PDGF-C and PDGF-D ligands may play a role in the development of brain tumors. *Cancer Res*, *62*(13), 3729-3735.
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvet, A., . . . Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*, *114*(2), 97-109. doi:10.1007/s00401-007-0243-4
- Ma, S., Lee, T. K., Zheng, B. J., Chan, K. W., & Guan, X. Y. (2008). CD133+ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway. *Oncogene*, *27*(12), 1749-1758. doi:10.1038/sj.onc.1210811
- Mann, K., & Mann, M. (2008). The chicken egg yolk plasma and granule proteomes. *Proteomics*, *8*(1), 178-191. doi:10.1002/pmic.200700790
- Martell, L. A., Agrawal, A., Ross, D. A., & Muraszko, K. M. (1993). Efficacy of transferrin receptor-targeted immunotoxins in brain tumor cell lines and pediatric brain tumors. *Cancer Res*, *53*(6), 1348-1353.
- McLendon, R. E., & Rich, J. N. (2011). Glioblastoma Stem Cells: A Neuropathologist's View. *J Oncol*, *2011*, 397195. doi:10.1155/2011/397195

- Miraglia, S., Godfrey, W., Yin, A. H., Atkins, K., Warnke, R., Holden, J. T., . . . Buck, D. W. (1997). A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood*, *90*(12), 5013-5021.
- Monzani, E., Facchetti, F., Galmozzi, E., Corsini, E., Benetti, A., Cavazzin, C., . . . La Porta, C. A. (2007). Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumorigenic potential. *Eur J Cancer*, *43*(5), 935-946. doi:10.1016/j.ejca.2007.01.017
- Motaln, H., Gruden, K., Hren, M., Schichor, C., Primon, M., Rotter, A., & Lah, T. T. (2012). Human mesenchymal stem cells exploit the immune response mediating chemokines to impact the phenotype of glioblastoma. *Cell Transplant*, *21*(7), 1529-1545. doi:10.3727/096368912X640547
- Narayanan, S., Surendranath, K., Bora, N., Surolia, A., & Karande, A. A. (2005). Ribosome inactivating proteins and apoptosis. *FEBS Lett*, *579*(6), 1324-1331. doi:10.1016/j.febslet.2005.01.038
- Narayanan, S., Surolia, A., & Karande, A. A. (2004). Ribosome-inactivating protein and apoptosis: abrin causes cell death via mitochondrial pathway in Jurkat cells. *Biochem J*, *377*(Pt 1), 233-240. doi:10.1042/BJ20030797
- Nduom, E. K., Hadjipanayis, C. G., & Van Meir, E. G. (2012). Glioblastoma cancer stem-like cells: implications for pathogenesis and treatment. *Cancer J*, *18*(1), 100-106. doi:10.1097/PPO.0b013e3182452e0d
- O'Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S., & Dick, J. E. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, *445*(7123), 106-110. doi:10.1038/nature05372
- Ogden, A. T., Waziri, A. E., Lochhead, R. A., Fusco, D., Lopez, K., Ellis, J. A., . . . Bruce, J. N. (2008). Identification of A2B5+CD133- tumor-initiating cells in adult human gliomas. *Neurosurgery*, *62*(2), 505-514; discussion 514-505. doi:10.1227/01.neu.0000316019.28421.95
- Otvos, B., Silver, D. J., Mulkearns-Hubert, E. E., Alvarado, A. G., Turaga, S. M., Sorensen, M. D., . . . Lathia, J. D. (2016). Cancer Stem Cell-Secreted Macrophage Migration Inhibitory Factor Stimulates Myeloid Derived Suppressor Cell Function and Facilitates Glioblastoma Immune Evasion. *Stem Cells*, *34*(8), 2026-2039. doi:10.1002/stem.2393
- Pallini, R., Ricci-Vitiani, L., Banna, G. L., Signore, M., Lombardi, D., Todaro, M., . . . De Maria, R. (2008). Cancer stem cell analysis and clinical outcome in patients with glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res*, *14*(24), 8205-8212. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0644
- Pastan, I., Hassan, R., Fitzgerald, D. J., & Kreitman, R. J. (2006). Immunotoxin therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*, *6*(7), 559-565. doi:10.1038/nrc1891
- Pernis, A., Witthuhn, B., Keegan, A. D., Nelms, K., Garfein, E., Ihle, J. N., . . . Rothman, P. (1995). Interleukin 4 signals through two related pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*(17), 7971-7975.
- Perry, A., & Wesseling, P. (2016). Histologic classification of gliomas. *Handb Clin Neurol*, *134*, 71-95. doi:10.1016/B978-0-12-802997-8.00005-0
- Persano, L., Rampazzo, E., Della Puppa, A., Pistollato, F., & Basso, G. (2011). The three-layer concentric model of glioblastoma: cancer stem cells, microenvironmental regulation, and therapeutic implications. *ScientificWorldJournal*, *11*, 1829-1841. doi:10.1100/2011/736480
- Piasecki, P. (1999). FDA approves fusion protein for treatment of lymphoma. *J Am Pharm Assoc (Wash)*, *39*(4), 571-572.
- Piccirillo, S. G., Binda, E., Fiocco, R., Vescovi, A. L., & Shah, K. (2009). Brain cancer stem cells. *J Mol Med (Berl)*, *87*(11), 1087-1095. doi:10.1007/s00109-009-0535-3
- Poduslo, J. F., Ramakrishnan, M., Holasek, S. S., Ramirez-Alvarado, M., Kandimalla, K. K., Gilles, E. J., . . . Wengenack, T. M. (2007). In vivo targeting of antibody fragments to the nervous system

- for Alzheimer's disease immunotherapy and molecular imaging of amyloid plaques. *J Neurochem*, 102(2), 420-433. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04591.x
- Polito, L., Djemil, A., & Bortolotti, M. (2016). Plant Toxin-Based Immunotoxins for Cancer Therapy: A Short Overview. *Biomedicines*, 4(2). doi:10.3390/biomedicines4020012
- Potala, S., Sahoo, S. K., & Verma, R. S. (2008). Targeted therapy of cancer using diphtheria toxin-derived immunotoxins. *Drug Discov Today*, 13(17-18), 807-815. doi:10.1016/j.drudis.2008.06.017
- Puri, R. K., Hoon, D. S., Leland, P., Snoy, P., Rand, R. W., Pastan, I., & Kreitman, R. J. (1996). Preclinical development of a recombinant toxin containing circularly permuted interleukin 4 and truncated *Pseudomonas* exotoxin for therapy of malignant astrocytoma. *Cancer Res*, 56(24), 5631-5637.
- Qu, X., & Qing, L. (2004). Abrin induces HeLa cell apoptosis by cytochrome c release and caspase activation. *J Biochem Mol Biol*, 37(4), 445-453.
- Rahman, S., Van Nguyen, S., Icatlo, F. C., Umeda, K., & Kodama, Y. (2013). Oral passive IgY-based immunotherapeutics: a novel solution for prevention and treatment of alimentary tract diseases. *Hum Vaccin Immunother*, 9(5), 1039-1048. doi:10.4161/hv.23383
- Rand, R. W., Kreitman, R. J., Patronas, N., Varricchio, F., Pastan, I., & Puri, R. K. (2000). Intratumoral administration of recombinant circularly permuted interleukin-4-*Pseudomonas* exotoxin in patients with high-grade glioma. *Clin Cancer Res*, 6(6), 2157-2165.
- Reardon, D. A., Rich, J. N., Friedman, H. S., & Bigner, D. D. (2006). Recent advances in the treatment of malignant astrocytoma. *J Clin Oncol*, 24(8), 1253-1265. doi:10.1200/JCO.2005.04.5302
- Richardson, G. D., Robson, C. N., Lang, S. H., Neal, D. E., Maitland, N. J., & Collins, A. T. (2004). CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J Cell Sci*, 117(Pt 16), 3539-3545. doi:10.1242/jcs.01222
- Sampson, J. H., Akabani, G., Archer, G. E., Bigner, D. D., Berger, M. S., Friedman, A. H., . . . Pastan, I. (2003). Progress report of a Phase I study of the intracerebral microinfusion of a recombinant chimeric protein composed of transforming growth factor (TGF)-alpha and a mutated form of the *Pseudomonas* exotoxin termed PE-38 (TP-38) for the treatment of malignant brain tumors. *J Neurooncol*, 65(1), 27-35.
- Sampson, J. H., Brady, M., Raghavan, R., Mehta, A. I., Friedman, A. H., Reardon, D. A., . . . Bigner, D. D. (2011). Colocalization of gadolinium-diethylene triamine pentaacetic acid with high-molecular-weight molecules after intracerebral convection-enhanced delivery in humans. *Neurosurgery*, 69(3), 668-676. doi:10.1227/NEU.0b013e3182181ba8
- Sampson, J. H., Reardon, D. A., Friedman, A. H., Friedman, H. S., Coleman, R. E., McLendon, R. E., . . . Bigner, D. D. (2005). Sustained radiographic and clinical response in patient with bifrontal recurrent glioblastoma multiforme with intracerebral infusion of the recombinant targeted toxin TP-38: case study. *Neuro Oncol*, 7(1), 90-96. doi:10.1215/S1152851703000589
- Sanai, N., Alvarez-Buylla, A., & Berger, M. S. (2005). Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med*, 353(8), 811-822. doi:10.1056/NEJMra043666
- Sell, S. (2004). Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*, 51(1), 1-28. doi:10.1016/j.critrevonc.2004.04.007
- Shen, G., Shen, F., Shi, Z., Liu, W., Hu, W., Zheng, X., . . . Yang, X. (2008). Identification of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line and the limitation of current identification methods. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 44(7), 280-289. doi:10.1007/s11626-008-9115-z
- Shih, S. F., Wu, Y. H., Hung, C. H., Yang, H. Y., & Lin, J. Y. (2001). Abrin triggers cell death by inactivating a thiol-specific antioxidant protein. *J Biol Chem*, 276(24), 21870-21877. doi:10.1074/jbc.M100571200

- Shimamura, T., Husain, S. R., & Puri, R. K. (2006). The IL-4 and IL-13 pseudomonas exotoxins: new hope for brain tumor therapy. *Neurosurg Focus*, *20*(4), E11. doi:10.3171/foc.2006.20.4.6
- Shimizu, M., Nagashima, H., Sano, K., Hashimoto, K., Ozeki, M., Tsuda, K., & Hatta, H. (1992). Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. *Biosci Biotechnol Biochem*, *56*(2), 270-274.
- Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., & Dirks, P. B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, *63*(18), 5821-5828.
- Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., . . . Dirks, P. B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, *432*(7015), 396-401. doi:10.1038/nature03128
- Stuart, C. A., Pietrzyk, R. A., Furlanetto, R. W., & Green, A. (1988). High affinity antibody from hen's eggs directed against the human insulin receptor and the human IGF-I receptor. *Anal Biochem*, *173*(1), 142-150.
- Stupp, R., Hegi, M. E., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Taphoorn, M. J., Janzer, R. C., . . . Group, N. C. I. o. C. C. T. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol*, *10*(5), 459-466. doi:10.1016/S1470-2045(09)70025-7
- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., . . . Group, N. C. I. o. C. C. T. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, *352*(10), 987-996. doi:10.1056/NEJMoa043330
- Suetsugu, A., Nagaki, M., Aoki, H., Motohashi, T., Kunisada, T., & Moriwaki, H. (2006). Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*, *351*(4), 820-824. doi:10.1016/j.bbrc.2006.10.128
- Sulman, E., Aldape, K., & Colman, H. (2008). Brain tumor stem cells. *Curr Probl Cancer*, *32*(3), 124-142. doi:10.1016/j.currprobcancer.2008.02.004
- Taylor, A. I., Gould, H. J., Sutton, B. J., & Calvert, R. A. (2008). Avian IgY binds to a monocyte receptor with IgG-like kinetics despite an IgE-like structure. *J Biol Chem*, *283*(24), 16384-16390. doi:10.1074/jbc.M801321200
- Taylor, M. D., Poppleton, H., Fuller, C., Su, X., Liu, Y., Jensen, P., . . . Gilbertson, R. J. (2005). Radial glia cells are candidate stem cells of ependymoma. *Cancer Cell*, *8*(4), 323-335. doi:10.1016/j.ccr.2005.09.001
- Thorpe, P. E., Blakey, D. C., Brown, A. N., Knowles, P. P., Knyba, R. E., Wallace, P. M., . . . Wawrzynczak, E. J. (1987). Comparison of two anti-Thy 1.1-abrin A-chain immunotoxins prepared with different cross-linking agents: antitumor effects, in vivo fate, and tumor cell mutants. *J Natl Cancer Inst*, *79*(5), 1101-1112.
- Uchida, N., Buck, D. W., He, D., Reitsma, M. J., Masek, M., Phan, T. V., . . . Weissman, I. L. (2000). Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(26), 14720-14725. doi:10.1073/pnas.97.26.14720
- Vallera, D. A., & Myers, D. E. (1988). Immunotoxins containing ricin. *Cancer Treat Res*, *37*, 141-159.
- Wang, J., Sakariassen, P., Tsinkalovsky, O., Immervoll, H., Bøe, S. O., Svendsen, A., . . . Enger, P. (2008). CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int J Cancer*, *122*(4), 761-768. doi:10.1002/ijc.23130
- Weaver, M., & Laske, D. W. (2003). Transferrin receptor ligand-targeted toxin conjugate (Tf-CRM107) for therapy of malignant gliomas. *J Neurooncol*, *65*(1), 3-13.
- Weigmann, A., Corbeil, D., Hellwig, A., & Huttner, W. B. (1997). Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to

- plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(23), 12425-12430.
- Wen, P. Y., & Kesari, S. (2008). Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med*, 359(5), 492-507. doi:10.1056/NEJMra0708126
- WILLIAMS, J. (1962). Serum proteins and the livetins of hen's-egg yolk. *Biochem J*, 83, 346-355.
- Wolf, P., & Elsässer-Beile, U. (2009). Pseudomonas exotoxin A: from virulence factor to anti-cancer agent. *Int J Med Microbiol*, 299(3), 161-176. doi:10.1016/j.ijmm.2008.08.003
- Yin, A. H., Miraglia, S., Zanjani, E. D., Almeida-Porada, G., Ogawa, M., Leary, A. G., . . . Buck, D. W. (1997). AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 90(12), 5002-5012.
- Yoshida, J. (1996). Molecular neurosurgery using gene therapy to treat malignant glioma. *Nagoya J Med Sci*, 59(3-4), 97-105.
- Zhang, M., Song, T., Yang, L., Chen, R., Wu, L., Yang, Z., & Fang, J. (2008). Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients. *J Exp Clin Cancer Res*, 27, 85. doi:10.1186/1756-9966-27-85
- Zhang, Y., Sun, X., Huang, M., Ke, Y., Wang, J., & Liu, X. (2015). A novel bispecific immunotoxin delivered by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells to target blood vessels and vasculogenic mimicry of malignant gliomas. *Drug Des Devel Ther*, 9, 2947-2959. doi:10.2147/DDDT.S79475
- Zheng, X., Shen, G., Yang, X., & Liu, W. (2007). Most C6 cells are cancer stem cells: evidence from clonal and population analyses. *Cancer Res*, 67(8), 3691-3697. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3912
- Zhou, L., Wei, X., Cheng, L., Tian, J., & Jiang, J. J. (2007). CD133, one of the markers of cancer stem cells in Hep-2 cell line. *Laryngoscope*, 117(3), 455-460. doi:10.1097/01.mlg.0000251586.15299.35
- Zhu, Y., Hu, Y., Cheng, M., Zeng, C. Y., Yang, Z., Zhou, X. D., . . . Lu, N. H. (2017). Establishment and Characterization of a Nude Mouse Model of Subcutaneously Implanted Tumors and Abdominal Metastasis in Gastric Cancer. *Gastroenterol Res Pract*, 2017, 6856107. doi:10.1155/2017/6856107
- Zovickian, J., Johnson, V. G., & Youle, R. J. (1987). Potent and specific killing of human malignant brain tumor cells by an anti-transferrin receptor antibody-ricin immunotoxin. *J Neurosurg*, 66(6), 850-861. doi:10.3171/jns.1987.66.6.0850