



Experiencia epistemológica en la elaboración de tecnología biomolecular como estrategia de la inmunoterapia génica

Epistemological experience in developing of biomolecular technology for immunogen therapy strategy

Experiência epistemológica no desenvolvimento de tecnologia biomolecular para a estratégia de terapia imunogene

Tatiana Castillo¹ Annabelle Trojan² Maria Claudia Noguera³ Lina Manuela Jay⁴ Cecilia Crane⁵
Alexander Shevelev⁶ Alvaro Alvarez⁷ Heliodor Kasprzak⁸ Gonzalo Melo⁹ Pedro Jose Penagos¹⁰
Beatriz Helena Aristizabal¹¹ Ignacio Briceño¹² Adis Ayala¹³ Huynh T. Duc¹⁴ Jerzy Trojan¹⁵

Fecha de recepción: marzo 2016

Fecha de aceptación: abril 2016

Para citar este artículo: Castillo, T.; Trojan, A.; Noguera, M.C.; Jay, L.M.; Crane, C.; Shevelev, A.; Álvarez, A.; Kasprzak, H.; Melo, G.; Penagos, P.J.; Aristizabal, B.H.; Briceño, I.; Ayala, A.; Duc, H. y Trojan, J. (2016). Experiencia epistemológica en la elaboración de tecnología biomolecular como estrategia de la Inmunoterapia génica. *Revista Científica*, 25, 228-240. **Doi:** [10.14483/udistrital.jour.RC.2016.25.a6](https://doi.org/10.14483/udistrital.jour.RC.2016.25.a6)

Resumen

Unos de los retos científicos de los últimos 40 años, ha sido la búsqueda de la herramienta para el tratamiento del tumor cerebral, el glioblastoma, mortales en el ciento por ciento de los casos, utilizando nuestro conocimiento de la evolución, la química de las proteínas, la genética, la biología molecular y la inmunología. Una estrategia eficiente, enfocada en el factor de crecimiento IGF-I presente en el desarrollo tumoral, se estableció

mediante la construcción de vectores expresando el IGF-I antisentido ARN o el IGF-I ARN formando ARN-ADN triple hélice. Estos vectores introducidos en las células cancerosas *in vitro* permiten detener por completo la síntesis de IGF-I en la traducción o a nivel de la transcripción respectivamente. Mientras la inyección *in vivo* induce el efecto antitumoral inmune (TCD8+) acompañado de aumento de la supervivencia media

1. Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Bogotá, Colombia. Contacto: sammy.320@hotmail.com
2. Fundación Universitaria Juan N. Corpas. Bogotá, Colombia. Contacto: anna.trojan@hotmail.fr
3. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. Contacto: m.noguera@javeriana.edu.co
4. Instituto Nacional de Salud. Bogotá, Colombia. Contacto: chlamyplasma@hotmail.com
5. Instituto Nacional de Salud. Bogotá, Colombia. Contacto: ccrane@ins.gov.co
6. Moscow University. Moscow, Russia. Contacto: a.shevelev@gmail.com
7. Universidad de Cartagena. Cartagena de Indias, Colombia. Contacto: alalvcon@unicartagena.edu.co
8. Nicolas Copernic University. Torun, Polonia. Contacto: kasprzakmed@wp.pl
9. Instituto Nacional de Cancerología. Bogotá, Colombia. Contacto: gonzalomelomez@gmail.com
10. Instituto Nacional de Cancerología. Bogotá, Colombia. Contacto: pjenagos@hotmail.com
11. Hospital Pablo Tobón Uribe. Medellín, Colombia. Contacto: baristizabal@hptu.org.co
12. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. Contacto: ibriceno@javeriana.edu.co
13. Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Bogotá, Colombia. Contacto: aayala@udistrital.edu.co
14. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Paul Brousse Hospital, Paris XI University, Francia. Contacto: guy.duc@inserm.fr
15. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Paul Brousse Hospital, Paris XI University, Francia. Contacto: genetherapy@hotmail.fr

de los pacientes. La primera tesis en Colombia que describe la tecnología utilizada se presentó en la Universidad Distrital, en febrero de 2016.

Keywords: antisentido, triple hélice, IGF-I, glioma, CD8+.

Abstract

We have been faced with a 40 year long challenge: how to establish tools that can be applied in the treatment of brain tumor - glioblastoma (100% fatal) - using our knowledge of evolution, chemistry of proteins, genetics, molecular biology and immunology. An efficient strategy targeting growth factor IGF-I, present in tumor development, was established by construction of vectors expressing either IGF-I antisense RNA or IGF-I RNA forming RNA-DNA triple helix. The vectors introduced in the cancer cells in vitro, enable to completely stop the synthesis of IGF-I: on translation or transcription level, respectively. When injected in vivo, these cells induce an immune anti-tumor effect (CD8+) accompanied by increase of the median survival of patients. The first thesis in Colombia describing the used technology, was presented in Distrital University in February 2016.

Palabras Clave: antisens; triple helix; IGF-I; glioma; CD8+.

Resumo

Um dos desafios científicos dos últimos 40 anos foi ferramenta de busca para o tratamento de tumor cerebral, glioblastoma, fatal em 100% dos casos, utilizando o nosso conhecimento da evolução, da química das proteínas, genética, biologia molecular e imunologia. Uma estratégia eficaz destinada a factor de crescimento IGF-I, presente no desenvolvimento do tumor, foi estabelecida pela construção de vetores que expressam o ARN anti-sentido de IGF-I ou ARN de IGF-I formando helice tripla ARN-ADN. Estes vetores introduzidos em células cancerosas in vitro, permita parar completamente a síntese de IGF-I no nível de tradução ou transcrição, respectivamente. Embora a injeção *in vivo*, induzir imunológico efeito antitumoral (TCD8 +), acompanhada por aumento da sobrevida média dos pacientes. A primeira tese na Colômbia, descrevendo a tecnologia

utilizada, foi apresentado no Universidade Distrital em fevereiro de 2016.

Palavras chave: anti-sentido; tripla hélice; IGF-I; glioma; CD8+.

Introducción

"El verdadero viaje de descubrimiento no consiste en buscar nuevos paisajes, sino en tener nuevos ojos".

Marcel Proust, En busca del tiempo perdido (1918).

Retos

Dos principales desafíos en la investigación biomédica fueron considerados durante los últimos treinta años: enfermedad de cáncer y enfermedades del sistema nervioso. El desafío común fueron los tumores de cerebro, especialmente el tumor maligno de cerebro - glioblastoma (Trojan *et al.*, 2007; Stupp *et al.*, 2008).

Reto 1: Este tumor es incurable y afecta 3-10 pacientes/100.000 personas/año. El tratamiento de tumores malignos mediante cirugía, radiación y hormonas, y quimioterapias son limitados en su eficacia; en el caso de glioblastoma, la sobrevida media es solo 10-14 meses. Si la investigación clínica no ha encontrado una solución, la investigación básica podría encontrar la respuesta biología, física o química.

Reto 2: Si bien en las décadas de 1970-1980, como ahora; qué conocemos acerca del cerebro, su desarrollo normal y neoplásico, su función y el tratamiento de las enfermedades que lo afectan.

En 1979, la primera descripción del desarrollo del sistema nervioso central (SNC) usó un nuevo marcador: la alfafetoproteína, y un modelo fetal de cerebro de rata (Trojan y Uriel, 1979). Mediante el mismo marcador, estudiaron el desarrollo del sistema nervioso central neoplásico en modelo de teratocarcinoma de ratón; esto demostró que hay una convergencia entre el desarrollo fetal embrionario y el desarrollo neoplásico (Trojan *et al.*, 1984). Este

descubrimiento ha facilitado el estudio del tumor de cerebro, el cual se considera como un caso especial del desarrollo general del SNC.

Admitiendo que cada enfermedad, incluyendo tumores cerebrales, constituyen un desequilibrio del proceso de vida y que la vida es, de acuerdo con la evolución, derivada de aminoácidos, entonces, la vida y el desbalance se relacionan con la presencia de proteínas; lógicamente, en tumores de cerebro, cada oncoproteína, debe ser dirigida mediante el uso de tecnologías químicas y de biología molecular. Por fortuna, una nueva oncoproteína, el factor de crecimiento IGF-I, fue localizada como un marcador que solo se encuentra en células gliales de desarrollo normal o neoplásico, pero ausente en las neuronales (Kiess *et al.*, 1989; Trojan *et al.*, 1992). IGF-I se considera como el factor de crecimiento más importante (Obrepalska *et al.*, 2003; Pollak, Schernhammer y Hankinson, 2004). Considerando la estrategia de anticuerpos dirigidos a la oncoproteína, no fueron eficientes en el tratamiento contra el cáncer; la única posibilidad fue detener la síntesis de la oncoproteína en la *fuentes* de traducción o en el nivel de transcripción y directamente en las células cancerosas. Esta hipótesis y nuestro conocimiento sobre la química y biología molecular fue una cosa, pero como se transforma esto en una técnica concreta, fue otra historia. Eso fue en general un problema epistemológico, señalado recientemente por Mosquera y Castelblanco (2015) “como integrar el conocimiento de la química con técnica”.

La selección del objetivo de nivel de traducción se hizo por tecnología antisentido (AS) (Rubenstein, Nicolas y Jacob, 1984) en el modelo de glioma de rata, mediante el uso de un vector que expresa antisentido IGF –I RNA (Trojan *et al.*, 1992). Este enfoque ha dado resultados positivos *in vitro*, y ha detenido la síntesis de IGF-I en cultivos celulares; *in vivo*, ha detenido el desarrollo neoplásico al igual que el nacimiento del dominio de la inmunoterapia génica del cáncer (Wikipedia. *Gene therapy*, 1990-2016). La eficiencia de la biología molecular mediante la técnica antisentido

se confirmó dirigiendo el factor IGF-I, en el nivel de transcripción mediante la técnica de triple hélice (Hélène, 1994) y con el mismo modelo de glioma de rata (Shevelev *et al.*, 1997).

También se han introducido tecnologías con éxito como AS en ensayos clínicos, las técnicas aplicadas en clínica, aquellas que apuntan a factores de crecimiento como IGF-I, TGFbeta or EGFR (Trojan *et al.*, 2003, 2010; Hutterer *et al.*, 2006; Schlingensiepen, Fischer-Blass, Schmaus y Ludwig, 2008; Hau, Jachimczak y Bogdahn, 2009; Gaffney, Soyer y Simpson, 2014).

Enfoque antisentido

Desde 1978 es conocido que los mensajeros antisentido (Rubenstein, Nicolas y Jacob, 1984; Dias y Stein, 2002) son producidos naturalmente y a veces eliminados en el proceso de replicación del ADN (no en bacterias donde mensajeros antisentido están presentes). Se demostró que este fenómeno es posible en veinte especies diferentes y con ello fue obtenida la producción de mensajeros artificiales antisentido en una cantidad importante (Tsai, Hu, Chu y Imae, 2011; Catuogno *et al.*, 2012; Caruso y Caffo, 2014). Ese no es el caso del hombre, donde el ARN antisentido se elimina inmediatamente en las células, razón por la cual la síntesis de antisentido artificial se convirtió en una estrategia útil. En enfoque de IGF-I antisentido, para que el ARN antisentido sea eficiente se deben producir 50 copias por célula en las células transfectadas (resultados no publicados). Estas secuencias son capaces de bloquear el ARN mensajero, así evitan la traducción y síntesis de la proteína específica. En la construcción del vector antisentido de IGF-I, fueron usados oligonucleótidos de 540 bp, derivados del primer promotor y del primer exón (Trojan *et al.*, 1992) (figura 1).

De los otros exones usados para construcción “no funcionales” solo se conoce que el primer promotor es el principal elemento para codificar la información del gen IGF-I (Obrepalska *et al.*, 2003), y este papel es esencial para la formación de la triple hélice (ver abajo).

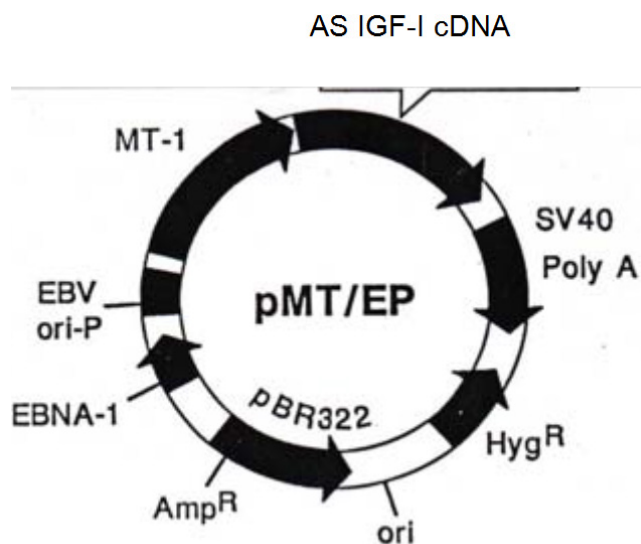


Figura 1. Representación del diagrama del vector de expresión IGF-I antisentido.

Fuente: elaboración propia.

El vector episomal se deriva de pMT/EP (vector vacío), fue construido usando cDNA de IGF-I insertado en orientación antisentido (AS IGF-I cDNA). El vector expresa AS IGF-I RNA para mRNA endógenos (Trojan et al, 1992). En el vector de expresión IGF-I triple hélice en vez de incluir cDNA de AS IGF-I, fue insertada una secuencia de 22 pb cuyo transcrito forma la estructura de triple hélice la cual corresponde a la secuencia del primer promotor del gen IGF-I (ver introducción – enfoque antisentido y triple hélice).

Enfoque de triple hélice

Desde los años 1990, en paralelo a la estrategia del ARN antisentido, la aproximación de la estrategia de triple hélice se ha convertido en una exitosa inducción en los ensayos de terapia génica y clínica (Thomas, Faaland, Galloy Thomas, 1999). La tecnología de triple hélice (TH) es el nuevo enfoque, el cual pertenece a una aproximación de antisentido y estrategias *sensu lato* antigén.

La tecnología TH fue descubierta por C. Hélène (1994) y su acción fue definida como la inhibición de la expresión génica a nivel de la transcripción,

en donde secuencias de 22-23 oligonucleótidos específicos (también llamados oligonucleótidos formadores de triple hélice, OFTH), son introducidos en células tanto por transfección química mediada por transportadores, como por plásmidos que pueden dirigir la síntesis de OFTH. Estos se vinculan al ADN genómico de doble hélice formando la estructura de triple hélice con el gen diana e inhiben fuertemente su transcripción, esto debido probablemente a que la estructura de triple hélice del ADN impide el paso de la ARN polimerasa (figura 2). Los OFTH usualmente son dirigidos contra secuencias localizadas en la región promotora de los genes de interés.

Ejemplos de la actividad inhibitoria de los OFTH sobre genes diana implicados en la tumorigénesis están actualmente disponibles (Giovannangeli y Hélène, 1997). La mayoría de los OFTH están dirigidos a secuencias de polipurinas y polipirimidinas localizadas en regiones promotoras del gen de interés y son introducidas a las células tumorales por transfección, utilizando varios transportadores químicos. Los OFTH generados *in situ* están protegidos de la degradación causada por nucleasas y pueden llegar a su destino (ADN) sin ser atrapados por las vesículas lisosomales. También pueden ser utilizados los mecanismos regulares de transfección para terapia génica. Una aplicación de este enfoque basado en la técnica de triple hélice de ADN ha sido utilizada para la inhibición de IGF-I el cual cumple un papel principal en la tumorigénesis (Shevelev *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2001) (figura 2).

ARN derivado del plásmido	3'__ AGAAGAGGGAGAGAGAGAGAAGG__5'
IGF-I - ADN genómico	5'--- AGAAGAGGGAGAGAGAGAGAAGG ----
IGF-I - ADN genómico	3'--- TCT TCT CCC TCT CTC TCT CTT CC ----

Figura 2. Estrategia triple hélice: secuencia de 23 oligonucleótidos preparados por PCR se incluye en el vector (Fig. 1).

Fuente: elaboración propia.

El vector se transfecta en células de cáncer que produce ARN de 23 oligonucleótidos - ARN derivado del plásmido; esta forma con IGF-I - ADN genómico (en el núcleo de la célula) el triple hélice ARN - ADN (Shevelev et al, 1997). Homopurina triple hélice se forma como sigue: [: : :] puentes de Hoogsteen, [; ; ;] puentes de Watson-Crick

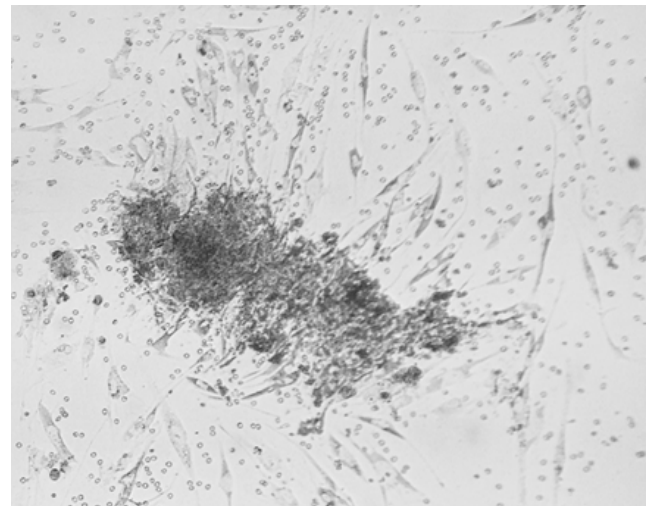
Los factores de crecimiento son conocidos porque desempeñan un papel muy importante en la tumorigénesis y, por ende, representan blancos relevantes en la terapia antigénica. La síntesis de factor de necrosis tumoral humano (TNF), que actúa como un factor de crecimiento autocrino en diversas líneas celulares tumorales, incluyendo neuroblastoma y glioblastoma, ha sido bloqueada por tratamiento con OFTH (Aggarwal, Schwarz, Hogan y Rando, 1996).

Metodología

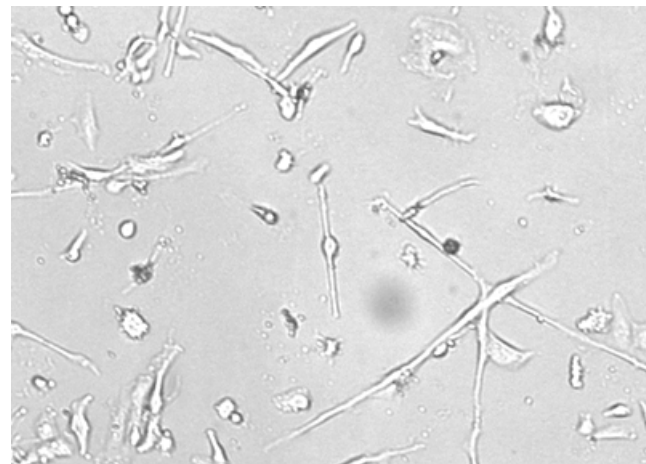
Los aspectos morfológicos de la línea glial humana son similares a células gliales murinas (Trojan *et al.*, 1992; Sia *et al.*, 2010; Di Tomaso *et al.*, 2010) (figura 3).

a) Células de tumor parental (flechas pequeñas), que empezaron proliferación a partir del tejido de biopsia (nota: el tejido de la biopsia se observa en color negro, flecha grande). Estas células se unen eficientemente después de 6 días de cultivo primario. b) Células gliales se observan en el mismo cultivo de la figura 3a después de dos semanas de incubación. Estas células primarias después de 3 semanas de incubación serán transfectadas con el vector mencionado en la figura 1. (a) x200, (b) x400.

Las células gliales murinas y humanas transfectadas (Trojan *et al.*, 1992; Li *et al.*, 2001) producen una gran cantidad de ARN antisentido. El trabajo estadístico sobre la transfección exitosa usando algún antisentido o vector de expresión de triple hélice, ha mostrado la obtención de mejores resultados con el vector de triple hélice (80 %), comparado con el antisentido (60 %) (Castillo, 2016). Por ejemplo, se puede demostrar por



a)



b)

Figura 3. Cultivo in vitro primario de células malignas humanas derivadas de biopsias de glioblastoma.

Fuente: elaboración propia.

inmunocitoquímica con la ayuda de un anticuerpo anti-IGF-1 que las células gliales no transfectadas son positivas para IGF-I. Por consiguiente, se demostró que el mensajero antisentido es efectivamente eficaz para inhibir la producción de la proteína diana (Trojan *et al.*, 1992, 1994, 2012).

Al igual las células transfectadas de cáncer *in vitro* expresan MHC-I y antígenos B7. Estas células son inmunogénicas (Trojan *et al.*, 1996). Las células no transfectadas no expresan antígenos MHC-I y B7. Esto quedó demostrado mediante la técnica

de análisis de citometría de flujo (Ly *et al.*, 2000, 2001; Trojan *et al.*, 2006), RT-PCR (Szpechcinski *et al.*, 2004) e inmunocitoquímica (Trojan *et al.*, 2006).

Resultados

Aplicación en el glioma de origen animal

Los resultados del estudio de inmunocitoquímica de células de gliomas (de ratón y relativamente de humanos) son representados en el tabla 1.

Células primarias de glioma humano HG (Ly *et al.*, 2001). NT: células parentales no transfectadas; pMT-EP: Transfección con "vector vacío", IGF-I o IGF-II AS: transfección con vectores expresión antisentido de IGF-I o IGF-II; IGF-I TH: transfección con vectores IGF-I triple hélice; IGF-I AS/ IGF-I TH: cotransfección con vectores antisentido y triple hélice; IGF-I AS/ MHC-I AS/ B7 AS, triple cotransfección. La transfección de células CNS-1 y HG fueron cultivadas en presencia de Zn²⁺, activas para el promotor de MT-I (Trojan *et al.*, 2006).

- La cuantificación intracelular de moléculas fue estimada por una técnica semicuantitativa inmunoperoxidasa (Trojan, Uriel, Deugnier y Gaillard, 1984; Trojan *et al.*, 1992). La intensidad de la tinción (++) fue comparada entre la diferencia de clones en la misma línea celular, por ejemplo en el caso de la línea CNS-1 se encontró solo una molécula.

La inyección subcutánea de células (2-3 x 10⁶) de la línea de glioma C6 no transfectadas en ratas singénicas (DBX), impulsan, después de diez días, al desarrollo de un tumor subcutáneo de la misma naturaleza histológica. Cuando las células de glioma son transfectadas con el vector portador del ADNc antisentido contra el IGF-I, el tumor no se desarrolla. La experiencia fue reproducible en 200 ratas. Después de la inyección de células de glioma en la parte occipital del cerebro, el tumor llega a desarrollarse en aproximadamente una semana. Tres semanas después del tratamiento de los animales portadores de tumores, los portaobjetos histológicos presentan, en la ubicación del tumor,

Tabla 1. Tinción inmunocitoquímica de IGF-I y de antígenos inmunogénicos MHC-I, MHC-II y B7 en glioma de ratón CNS1 (Trojan et al., 1996).

Células	IGF-I	MHC-I	MHC-II	B7
<u>Glioma de rata CNS-1:</u>				
NT	+++ *	-	-	-
pMT-EP	+++	-	-	-
IGF-I AS	-	++	-	++
IGF-I TH	-	++	-	++
IGF-I AS/ IGF-I TH	-	++	-	++
IGF-II AS	+++	-	-	-
IGF-IAS/MHC-IAS/B7AS	-	-	-	-
IGF-ITH/MHC-IAS/B7AS	-	-	-	-
<u>Glioma primaria humana HG :</u>				
NT	++	-	-	-
pMT-EP	++	-	-	-
IGF-I AS	-	++	-	+
IGF-I TH	-	++	-	+
IGF-I AS/ IGF-I TH	-	++	-	+
IGF-II AS	++	-	-	-
IGF-IAS/MHC-IAS/B7AS	-	-	-	-
IGF-ITH/MHC-IAS/B7AS	-	-	-	-

Fuente: elaboración propia.

solo colágeno y una importante infiltración linfoplasmocitaria específicamente los linfocitos T citotóxicos CD8+ (Trojan *et al.*, 1993) (figura 4).

En el control de experimentos *in vivo*, el uso de modelos de otros tumores como el hepatoma murino y teratocarcinoma murino, se han obtenido resultados similares (Trojan *et al.*, 1994; Lasfarge-Frayssinet *et al.*, 1997; Upegui-Gonzalez *et al.*, 1998).

Aplicación clínica en terapia de glioma

Los cultivos primarios de células de glioma fueron obtenidos a partir de biopsias de glioblastoma humano (Ly *et al.*, 2001).

expresan ARN antisentido de IGF-I, y se convierten negativamente para el IGF-I y positivamente para MHC-I y B7. Por otra parte se convierten en células apoptóticas. Ambos fenómenos, inmunológico y apoptosis, se relacionan con la vía de transducción de señal. Las células inyectadas transfectadas incluyendo las células apoptóticas, junto con las células inducidas de APC *in vivo*, activan los linfocitos T (CTL CD8+CD28+). Los CTL activados producen una respuesta inmune antitumoral. Abreviaturas: TAP 1,2 (transporter associated with antigen processing antigen); TK (tyrosine kinase); PI3K (phosphatidyinositol 3 kinase); PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase 1); AKT (PKB, protein kinase B); Bcl 2 (key molecule of apoptosis); GSK3 (glycogene synthetase kinase 3); GS (glycogene synthetase PKC (protein kinase C) Beckner *et al.* (2005); Lemoine *et al.* (2009); Chappert *et al.* (2010); Pan *et al.* (2013).

Las líneas celulares de glioma humano fueron transfectadas con el vector TH pMT-AG *triple hélice* y con vector el AS pMT- IGF-I (Trojan *et al.*, 1992; Shevelev *et al.*, 1997). Los clones de células transfectadas sin expresión de IGF-I, y expresión regular de MHC-I y B7 moléculas, demostrado por análisis de citometría de flujo, fueron seleccionados después de dos meses contados a partir de la transfección (Trojan *et al.*, 2012; Rodríguez *et al.*, 2012).

Les tres inyecciones fueron realizadas utilizando un millón de células (inyectadas por vía subcutánea). La sangre fue recolectada después de la primera, segunda y tercera inyección. La tipificación de los linfocitos de sangre periférica (PBL) se realizó utilizando anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra los antígenos de las células superficiales (Trojan *et al.*, 2003). Los cambios fenotípicos en linfocitos de sangre periférica fueron los siguientes: aumento en el porcentaje de células T CD8+ con CD8+CD11b- y fenotipo CD8+CD28+ después de cada una de las tres vacunaciones (Trojan *et al.*, 2010; Trojan y Briceno, 2013) (figura 4). Adicionalmente, se observó un aumento del porcentaje de los linfocitos positivos

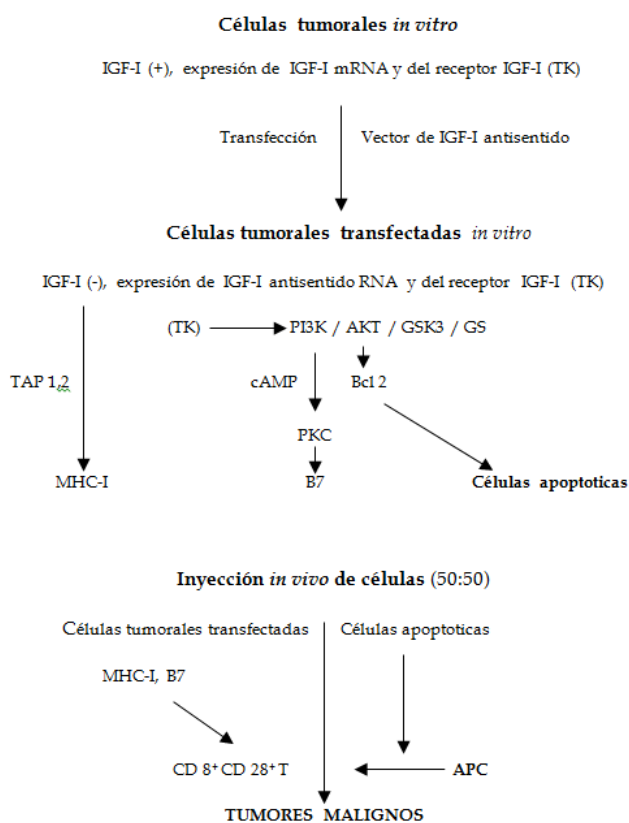


Figura 4. Terapia antisentido anti IGF-I.

Fuente: elaboración propia.

Después de la transfección *in vitro* de las células tumorales con un vector que contiene el IGF-I de ADNc en orientación antisentido, las células

para el receptor superficial de interleuquina-2 (CD25) después de las inyecciones 2 y 3. No fueron demostrados cambios en otras moléculas CD.

Los resultados prometedores fueron obtenidos en los pacientes de los Hospitales Universitarios de Cleveland, de Bangkok y de Bromberg (Programa Científico de la OTAN - EE.UU. / Francia / Polonia/ Alemania; N° LST 980517). El promedio de vida media del momento de diagnóstico al momento de fallecer oscilaba entre 19 y 24 meses. En pacientes tratados del grupo control, la vida media era de 9,5-10 meses (Trojan et al, 2012 y 2014).

Discusión

Esta revisión llama la atención sobre los últimos estudios en el área de la terapia Anti-Gene (AS, TH, siRNA) del cáncer (Wongkajornsilp et al., 2001; Hegi et al., 2005; Piwecka et al., 2011; Trojan et al., 2014; Zhu et al., 2015; Castillo, 2016). Entre las nuevas estrategias de terapia basadas en biología molecular para tratar glioblastoma y otros tumores malignos, especialmente el uso de un enfoque específico contra IGF-I, TGF-beta, VEGF o EGF (Pan, Luo y Chegini, 2007; Moro-Sibillot, Coudurier y Lantuejous, 2010; Sachdev, 2010; Schlingensiepen et al., 2011; Yang et al., 2011) y sus receptores (Andrews et al., 2001; Baserga, 2005; Hutterer, Gunsilius, E. y Stockhammer, 2006; Choi et al., 2009; Li et al., 2010; Kalman, Szep, Garzuly y Post, 2013; Gaffney, Soyer y Simpson, 2014), y la transducción de sus elementos de señalización (Lo, 2010; Zhang et al, 2010) parece ofrecer la esperanza de una solución prometedora.

La seguridad del método en genética es garantizada por el uso de un vector episomal, a diferencia de otras técnicas de terapia génica que están basadas en vectores retrovirales que implican en teoría el riesgo de la integración del vector en el ADN, por la ausencia de vectores episomales, lo cual fue señalado por NIH en USA (Ilan, 1993), con el uso de terapia antisentido, AS y triple hélice, TH anti - IGF-I (vector episomal) (Trojan et al., 2012 y 2014).

El glioblastoma, así como otros tumores malignos, fueron recientemente tratados con éxito mediante terapia antisentido focalizada en TGF-beta, usando un vector para la expresión de antisentido anti TGF beta (Fakhrai et al., 2006). La estrategia de tratamiento del glioblastoma con IGF-I-R no se continuó, parece que esta terapia podría ser más eficiente si las "vacunas celulares" fueran preparadas después de la clonación de las células antisentido de IGF-I-R para la expresión de MHC-I.

Otras técnicas recientes incluyen los potencialmente útiles siRNA (ARN pequeño de interferencia) (Boado, 2005; Pai et al., 2006) y miARN (microARN) (Berezikov et al., 2006). El papel de estos siARN en el silenciamiento de genes es muy similar a la del mecanismo de TH (Hélène, 1994). Sea o no que la tecnología siRNA o miRNA suplante los enfoques del uso de oligodesoxinucleótidos, permanece en cuestión en este momento, porque aún no hay resultados clínicos finales.

El mecanismo de la terapia antisentido focaliza factores de crecimiento y sus receptores (IGF-I, TGF-beta, EGF, IGF-I-R, EGF-R), lo cual es una combinación de un aumento de la respuesta inmune antitumoral (CD8+) una inhibición de la vía de transducción de la señal PI3K/AKT/GWK3/GS que está implicada en el fenotipo transformado del tumor (Ly et al., 2001; Hau, Jachimczak, Schlaier y Bogdahn, 2011; Trojan y Briceño, 2013) (figura 4).

Para que la célula CD8+ ejerza su efecto citotóxico, es necesaria la formación de un puente entre esta y los antígenos de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC I se relaciona con la expresión de TAP1 y TAP2) (Pan et al., 2013). En el bazo, los linfocitos citotóxicos son vehiculizados a través de la sangre y se concentran en el tumor durante su regresión (Trojan et al., 1993, 1994; Wongkajornsilp et al., 2001).

En cuanto a la vía PI3K/AKT/GWK3/GS, en relación con terapia de glioma, se considera que se ha demostrado en el experimento antisentido antiglicógeno sintetasa, GS, que las células transfectadas AS GS también eran inmunogénicas (expresión de MHC-I) (Premkumar, Arnold, Jane y Pollack, 2006:

Ardourel *et al.*, 2007). El IGF-I, a través de su unión a IGF-I-R, activa la cascada de transducción PI3K/AKT; además, ha sido reportado como bloqueador de la vía de la apoptosis (IRS/PI3K/AKT/Bcl o AKT/GSK3 o Ca²⁺ o caspasas). El resultado final del enfoque AS IGF-I incluye la inhibición de los elementos de la vía TK/PI3K/AKT como respuesta inmune mediada *in vivo* por los linfocitos T CD8 y las células APC (Baserga, 2005; Trojan *et al.*, 2007, 2014).

Agradecimientos

Los autores recibieron el apoyo de las subvenciones del Programa de Ciencia: el INS (Dr J.C. Dib, Departamento de Investigación) y la Sociedad ICGT S.A.S. de Bogotá.

Conflicto De Intereses

No hay conflicto de intereses. Autorización de Comités de Ética para la experimentación en animales y en humanos se describió previamente (Trojan *et al.*, 2012).

Referencias Bibliográficas

- Aggarwal, B.; Schwarz, L.; Hogan, M. y Rando, R. (1996). Triple helix forming Oligodeoxyribonucleotides targeted to the human tumor necrosis factor (TNF) gene inhibit TNF production and block the TNF dependent growth of human glioblastoma tumor cells. *Cancer Research*, 56, 5156-5164. <http://cancerres.aacr-journals.org/>
- Andrews, D.W.; Resnicoff, M.; Flanders, A.E.; Kenyon, L.; Curtis, M.; Merli, G.; *et al.* (2001). Results of a pilot study involving the use of an antisense oligodeoxynucleotide directed against the insulin-like growth factor type I receptor in malignant astrocytomas. *Journal of Clinical Oncology*, 19, 2189-2200.
- Ardourel, MY.; Blin, M.; Moret, JL.; Dufour, T.; Duc, H.T.; Hevor, T.; *et al.* (2007). A new putative target for antisense gene therapy of glioma: glycogen synthetase. *Cancer Biology and Therapy*, 6(5), 719-723. <http://dx.doi.org/10.4161/cbt.6.5.4232>
- Baserga R. (2005). The Insulin-like Growth Factor-I receptor as a target for cancer therapy. *Expert Opinion in Therapy Targets*, 9, 753-768. <http://dx.doi.org/10.1517/14728222.9.4.753>
- Beckner, M.E.; Gobbel, G.T.; Abounader, R.; Burovic, F.; Agostino, N.R.; Laterra, J.; *et al.* (2005). Glycolytic glioma cells with active glycogen synthase are sensitive to PTEN and inhibitors of PI3K and gluconeogenesis. *Laboratory Investigation*, 85(12), 1457-1470. <http://dx.doi.org/10.1097/01.lab>
- Berezikov, E.; Thuemmler, F.; Van Laake, L.W.; *et al.* (2006). Diversity of microRNAs in human and chimpanzee brain. *Nature Genetics*, 38(12), 1375-7.
- Boado, R.J. (2005). RNA interference and nonviral targeted gene therapy of experimental brain Cancer. *NeuroRx*, 2(1), 139-150.
- Caruso, G. y Caffo, M. (2014). Antisense oligonucleotides in the treatment of cerebral gliomas. Review of concerning patents. *Recent Patents on CNS Drug Discovery*, 9(1), 2-12. <http://dx.doi.org/10.2174/15748890978845>.
- Castillo T. (2016). *Análisis de la expresión del gen IGF-I identificado como oncogén en células de glioma de ratón parentales y transfectadas usando estrategia de terapia génica por triple hélice y antisentido*. Trabajo de grado. Bogotá: Universidad Distrital, Programa de Licenciatura en Química.
- Catuogno, S.; Esposito, C.L.; Quintavalle, C.; Condorelli, G.; de Franciscis, V. y Cerchia, L. (2012). Nucleic acids in human glioma treatment: innovative approaches and recent results. *Journal of Signal Transduction*, ID: 735135. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/735135>
- Choi, B.D.; Archer, G.E.; Mitchell, D.A.; Heimberger, A.B.; McLendon, R.E.; Bigner, D.D.; *et al.* (2009). EGFRvIII-targeted vaccination therapy of malignant glioma. *Brain Pathology*, 19(4), 713-723. doi:10.1111/j.1750-3639.2009.00318.x

- Dias, N. y Stein, C.A. (2002). Basic concepts and antisense oligonucleotides mechanisms. *Molecular Cancer and Therapeutics*, 1, 347-355. <http://mct.aacrjournals.org/site/misc/journalifora.xhtml>
- Di Tomaso, T.; Mazzoleni, S.; Wang, E.; Sovena, G.; Clavenna, D.; Franzin A.; et al. (2010). Immunobiological characterization of cancer stem cells isolated from glioblastoma patients. *Clinical Cancer Research*, 16, 800-813. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2730>
- Fakhrai, H.; Mantil, J.C.; Liu, L.; Lin, H.; Mercola, D.; Black, K.L.; et al. (2006). Phase I clinical trial of a TGF-beta antisense-modified tumor cell vaccine in patients with advanced glioma. *Cancer Gene Therapy*, 13(12), 1052-1060. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cgt.7700975>
- Gaffney, D.C.; Soyer, H.P. y Simpson, F. (2014). The epidermal growth factor receptor in squamous cell carcinoma: An emerging drug target. *Australasian Journal of Dermatology*, 55(1), 24-34. <http://dx.doi.org/10.1111/ajd>
- Giovannangeli, C. y Hélène, C. (1997). Progress in developments of triplex based strategies. *Antisense Nucleic Acid Drug Development*, 7, 413-421. <http://dx.doi.org/10.1002/anie>
- Hau, P.; Jachimczak, P. y Bogdahn, U. (2009). Treatment of malignant gliomas with TGF-beta2 antisense oligonucleotides. *Expert Review in Anticancer Therapy*, 9(11), 1663-1674. <http://dx.doi.org/10.1586/era.09.138>
- Hau, P.; Jachimczak, P.; Schlaier, J. y Bogdahn, U. (2011). TGF-β2 signaling in high-grade gliomas. *Current Pharmacology and Biotechnology*, 12, 2150-2157. <http://dx.doi.org/10.2174>
- Hegi, M.E.; Diserens, A.C.; Gorlia, T.; Hamou, M.F.; De Tribolet, N.; Weller, M.; et al. (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352, 997-1003. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa043331>
- Hélène, C. (1994). Control of oncogene expression by antisense nucleic acid. *European Journal of Cancer*, 30A, 1721-1726. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.1994>
- Hutterer, M.; Gunsilius, E. y Stockhammer, G. (2006). Molecular therapies for malignant glioma. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 156(11-12), 351-363. <http://link.springer.com/journal/10354>
- Ilan, J. (1993). *Clinical trial: Gene therapy for human brain tumours using episome based antisense cDNA transcription of Insulin like Growth Factor I. Proposal for a Phase One gene therapy clinical study*. Protocol NIH no 1602. Maryland: Bethesda.
- Kalman, B.; Szep, E.; Garzuly, F. y Post, D.E. (2013). Epidermal growth factor receptor as a Therapeutic target in glioblastoma. *Neuromolecular Medicine*, 15(2), 420-434. doi:10.1007/s12017-013-8229-y
- Kiess, W.; Lee, L.; Graham, D.E.; Greenstein, L.; Tseng, L.Y.; Rechler, M.M. y Nissley, S.P. (1989). Rat C6 glial cells synthesize insulin-like growth factor I (IGF-I) and express IGF-I receptors and IGF-II/mannose 6-phosphate receptors. *Endocrinology*, 124, 1727-1736.
- Lasfarge-Frayssinet, C.; Duc, H.T.; Sarasin, A.; Fraysinet, C.; Anthony, D.D.; Guo, Y.; et al. (1997). Antisense IGF-I transfer into a rat hepatoma cell line inhibits tumorigenesis by modulating MHC-I. *Cancer Gene Therapy*, 4(5), 276-285. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cgt.7700975>
- Lemoine, F.M.; Cherai, M.; Giverne, C.; Dimitri, D.; Rosenzweig, M.; Trebeden-Negre, H.; et al. (2009). Massive expansion of regulatory T-cells following interleukin 2 treatment during a Phase I-II dendritic cell-based immunotherapy of metastatic renal cancer. *International Journal of Oncology*, 235, 569-581.
- Li, Y.; Jia, Q.; Zhang, J.; Han, L.; Xu, D.; Zhang, A.; et al. (2010). Combination therapy with Gamma Knife radiosurgery and antisense EGFR for malignant glioma in vitro and orthotopic xenografts. *Oncology Report*, 23(6), 1585-1591.
- Lo, H.W. (2010). Targeting Ras-RAF-ERK and its interactive pathways as a novel

- therapy for malignant gliomas. *Current Cancer Drug Targets*, 10, 840-848. <http://dx.doi.org/10.2174/156800910793357970>
- Ly, A.; Bouchaud, A.; Henin, D.; Sanson, M.; Delattre, J.Y.; Pan Y.; *et al.* (2000). Expression of IGF-I in glioma cells is associated with change in both immunogenicity and apoptosis. *Neuroscience Letters*, 281, 13-16. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3940\(96\)12770-1](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3940(96)12770-1)
- Ly, A.; Duc, H.T.; Kalamarides, M.; Pan, Y.; Shevelev, A.; François, J.C.; *et al.* (2001). Human glioma cells transformed by IGF-I triple-helix technology show immune and apoptotic characteristics determining cell selection for gene therapy of glioblastoma. *Journal of Clinical Pathology (Molecular Pathology)*, 54(4), 230-239. <http://dx.doi.org/10.1136/mp.54.4.230>
- Moro-Sibilot, D.M.; Coudurier, M. y Lantuejou, S. (2010). Targeting Insulin-like Growth Factors in the treatment of cancer. *Review des Maladies Respiratoires*, 27, 959-963. <http://www.sciencedirect.com/science/journal/07618425>
- Mosquera, C.J. y Castiblanco, O.L. (2015). El cambio didáctico y la epistemología. *Revista Góndola*, 10(1), 8-15. <http://dx.doi.org/10.14483/udistrital.jour.GDLA.2015.1.a00>
- Obrepalska, A.; Kedzia, A.; Trojan, J. y Gozdzicka-Jozefiak, A. (2003). Analysis of coding and promoter sequence of IGF-I gene in children with growth disorders presenting normal level of growth hormone. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 16(9), 1267-75. <http://dx.doi.org/10.14740>
- Pai, S.I.; Lin, Y.Y.; Macaes, B.; Meneshian, A.; Hung, C.F. y Wu, T.C. (2006). Prospects of RNA interference therapy for cancer. *Gene Therapy*, 13(6), 464-477. <http://www.genetherapyreview.com/gene-therapy-publications/journals>
- Pan, Q.; Luo, X. y Chegini, N. (2007). Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti VEGF to inhibit tumor growth. *Cancer Cell*, 11(1), 53-67. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.018>
- Pan, Y.; Trojan, J.; Guo, Y. y Anthony, D.D. (2013). Rescue of MHC-1 antigen processing machinery by down-regulation in expression of IGF-I in human glioblastoma cells. *PLoS ONE*, 8, ID:e58428. <http://dx.doi.org/10.1007/s11936-00ç-0012-x>
- Piwecka, M.; Rolle, K.; Wyszko, E.; Żukiel, R.; Nowak, S.; Barciszewska, M.Z.; *et al.* (2011). Nucleic acid-based technologies in therapy of malignant gliomas. *Current Pharmacological Biotechnology*, 12, 1805-1822. <http://dx.doi.org/10.2174/138920111798377067>
- Pollak, M.N.; Schernhammer, E.S. y Hankinson, S.E. (2004). Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nature Review Cancer*, 4, 505-518. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc>
- Premkumar, D.R.; Arnold, B.; Jane, E.P. y Pollack, I.F. (2006): Synergistic interaction between 17 AAG and phosphatidylinositol 3-kinase inhibition in human malignant glioma cells. *Molecular Carcinogenesis*, 45, 47-59. <http://dx.doi.org/10.1002/mc.20152>
- Rodríguez, J.A.; Galeano, L.; Palacios, D.M.; Gómez, C.; Serrano, M.L.; Bravo, M.M., *et al.* (2012). Altered HLA class I and HLA-G expression is associated with IL-10 expression in patients with cervical cancer. *Pathobiology*, 79, 72-83. <http://dx.doi.org/10.1159/000334089>
- Rubenstein, J.L.; Nicolas, J.F. y Jacob, F. (1984). Nonsense RNA: a tool for specifically inhibiting the expression of a gene in vivo. *Compte Rendu d'Academie de Science Paris III*, 299, 271-274. <http://dx.doi.org/10.1090/S0002-9947-1952-0051341-6>
- Sachdev, D. (2010). Targeting the type I Insulin-like Growth Factor system for breast cancer therapy. *Current Drug Targets*, 11, 1121-1132. <http://dx.doi.org/10.2174/138945010792006816>
- Schlingensiepen, K.H., Fischer-Blass, B., Schmaus, S. y Ludwig, S. (2008). Antisense therapeutics

¹³. Véase un cronograma de la historia del ADN en <http://www.dnai.org/timeline/index.html>

- for tumor treatment: the TGF-beta2 inhibitor AP 12009 in clinical development against malignant tumors. *Recent Results in Cancer Research*, 177, 137-150. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-71279-4-16>
- Schlingensiepen, K.H.; Jaschinski, F.; Lang, S.A.; Moser, C.; Geissler, E.K.; Schlitt, H.J.; et al. (2011). Transforming growth factor-beta 2 gene silencing with trabedersen (AP 12009) in pancreatic cancer. *Cancer Science*, 102(6), 1193-200. doi:10.1111/j.1349-7006.2011.01917
- Shevelev, A.; Burfeind, P.; Schulze, E.; Rininsland, F.; Johnson, T.; Trojan J.; et al. (1997) Potential triple helix mediated inhibition of IGF I gene expression significantly reduces tumorigenicity of glioblastoma in an animal model. *Cancer Gene Therapy*, 4(2), 105-112. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cgt.7700975>
- Sia, K.C.; Chong, W.K.; Ho, I.A.; Yulyana, Y.; Endaya, B.; Huynh, H.; et al. (2010). Hybrid Herpes Simplex virus/Epstein-Barr virus amplicon viral vectors confer enhanced transgene expression in primary human tumors and human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Gene Medicine*, 12, 848-858. <http://dx.doi.org/10.1002/jgm.1506>
- Stupp, R. y Hottinger, A.F. (2008). Management of malignant glioma - Quo vadis? *Onkologie*, 31, 300-302. <http://dx.doi.org/10.1159/000134024>
- Szpechcinski, A.; Trzos, R.; Jarocki, P.; Trojan, L.A.; Oficjalska, K.; Junkiert, A.; et al. (2004). Presence of MHC-I in rat glioma cells expressing antisense IGF-I-Receptor RNA. *Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku. Advances of Medical Science*, 49(1), 98-104. <http://www.advms.pl/>
- Thomas, T.; Faaland, C.; Gallo, M. y Thomas, T. (1999). Suppression of c myc oncogene. Expression by a polyamine complexed triplex forming oligonucleotide in MCF 7 breast cancer cells. *Nucleic Acids Research*, 23, 3594-3599. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/23.17.3594>
- Trojan, J. y Uriel, J. (1979). Intracellular localisation of alphafetoprotein and serum albumin in the central nervous system of the rat during fetal and postnatal development. *Compte Rendu d'Academie de Science*, 289(15), 1157-1160. <http://dx.doi.org/10.2517>
- Trojan, J.; Uriel, J.; Deugnier, M.A. y Gaillard, J. (1984). Immunocytochemical quantitative study of alpha-fetoprotein in normal and neoplastic neural development. *Developmental Neuroscience*, 6, 251-59. <http://dx.doi.org/10.1097/00001756-200307180-00016>
- Trojan, J.; Blossey, B.K.; Johnson, T.; Rudin, S.; Tykocinski, M.; Ilan, J.; et al. (1992). Loss of tumorigenicity of rat glioblastoma directed by episome-based antisense cDNA transcription of insulin-like growth factor I. *Proceeding of National Academy of Science USA*, 89(11), 4874- 4878. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.93.7.2909>
- Trojan, J.; Johnson, T.R.; Rudin, S.D.; Ilan, Ju.; Tykocinski, M.L. y Ilan, J. (1993). Treatment and prevention of rat glioblastoma by immunogenic C6 cells expressing antisense Insulin like Growth Factor I RNA. *Science*, 259, 94-97. <http://www.sciencedirect.com>
- Trojan, J.; Johnson, T.; Rudin, S.; Blossey, B.; Kelley, K.; Shevelev, A., et al. (1994). Gene therapy of murine teratocarcinoma: separate functions for insulin-like growth factors I and II in immunogenicity and differentiation. *Proceeding of National Academy of Science USA*, 91, 6088-6092. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.93.7.2909>
- Trojan, J.; Duc, H.T.; Upegui Gonzalez, L.; Hor, F.; Guo, Y.; Anthony, D.D.; et al. (1996). Presence of MHC-I and B 7 molecules in rat and human glioma cells expressing antisense IGF I mRNA. *Neuroscience Letters*, 212, 9-12. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3940\(96\)12770-1](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3940(96)12770-1)
- Trojan, L.A.; Kopinski, P.; Mazurek, A.; Chyczewski, L.; Ly, A.; Jarocki, P.; et al. (2003). IGF-I Triple Helix Gene Therapy of Rat and Human Gliomas. *Annales Academiae Medicae*

- Bialostocensis* (*Roc Akad Med Bial*), 48, 18-27. <http://www.advms.pl/>
- Trojan, L.A.; Li, A.; Kopinski, P.; Ardourel, M.Y.; Dufour, T.; Duc, H.T.; et al. (2006). Antisense and triple helix anti IGF-I tumours vaccines - gene therapy of gliomas. *International Journal of Cancer Prevention*, 2(4), 227-243. <http://dx.doi.org/10.15430/JCP>
- Trojan, J.; Cloix, J-F.; Ardourel, M-Y.; Chatel, M. y Anthony, D.D. (2007) Insulin-like growth factor type 1 biology and targeting in malignant glioma. *Neuroscience*, 145, 795-811. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.01.021>
- Trojan, J.; Ly, A.; Wei, M.X.; Kopinski, P.; Ardourel, M.Y.; Pan, Y.; et al. (2010). Antisense anti IGF-I cellular therapy of malignant tumours: immune response in cancer patients. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 64, 576-578. <http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>
- Trojan, J.; Pan, Y.X.; Wei, M.X.; Ly, A.; Shevelev, A.; Bierwagen, M.; et al. (2012). Methodology for anti-gene anti IGF-I therapy of malignant tumours. *Chemotherapy Research and Practice*, ID 520701. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/520701>
- Trojan, J. y Briceño, I. (2013). *IGF-I antisense and triple-helix gene therapy of glioblastoma*. En: T. Lichtor (ed.). *Evolution of the Molecular Biology of Brain Tumors and the Therapeutic Implications* (pp. 149-166). Rijeka: InTech.
- Trojan, A.; Jay, L.M.; Kasprzak, H.; Anthony, D.D. y Trojan, J. (2014). Immunotherapy of malignant tumors using antisense anti-IGF-I approach: case of glioblastoma. *Journal of Cancer Therapy*, 5, 685-705. <http://dx.doi.org/10.4236/jct.2014>
- Tsai, Y.J.; Hu, C.C.; Chu, C.C. y Imae, T. (2011). Intrinsically fluorescent PAMAM dendrimer as gene carrier and nanoprobe for nucleic acids delivery: bioimaging and transfection study. *Biomacromolecules*, 12, 4283-4290. <http://dx.doi.org/10.1021/bm>
- Upegui-Gonzalez, L.C.; Duc, H.T.; Buisson, Y.; Arborio, M.; Lafarge-Frayssinet, C.; Jasmin, C.; et al. (1998). Use of antisense strategy in the treatment of the hepatocarcinoma. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 451, 35-42. <http://dx.doi.org/10.4161/doi.org/10.1158/1078-0432>
- Wongkajornsilp, A.; Ouyprasertkul, M.; Sangruchi, T.; Huabprasert, S.; Pan, Y. y Anthony D.D. (2001). The analysis of peri-tumour necrosis following the subcutaneous implantation of autologous tumor cells transfected with an episome transcribing an antisense IGF-I RNA in a glioblastoma multiforme subject. *Journal of Medical Association of Thai*, 4(3), 740-747.
- Yang, L.; Lin, Z.; Huang, Q.; Lin, J.; Chen, Z.; Zhou, L.; et al. (2011). Effect of vascular endothelial growth factor on remodeling of C6 glioma tissue in vivo. *Journal of Neuro-Oncology*, 103(1), 33-41. doi:10.1007/s11060-010-0356-9
- Zhang, J.; Han, L.; Zhang, A.; Wang, Y.; Yue, X.; You, Y.; et al. (2010). AKT2 expression is associated with glioma malignant progression and required for cell survival and invasion. *Oncology Report*, 24(1), 65-72.
- Zhu, C.; Trabado, S.; Fan, Y.; Trojan, J.; Lone, Y.C.; Giron-Michel, J.; et al. (2015). Characterization of effector components from the humoral and cellular immune response stimulated by melanoma cells exhibiting modified IGF-1 expression. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 70, 53-57. doi:10.1016/j.biopha.2015.01.002

