



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Química

**Desarrollo de un modelo *in vivo* de glioblastoma humano en
la corteza prefrontal de la rata**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ANDREA CÁZARES LÓPEZ



Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: IGNACIO CAMACHO ARROYO
VOCAL: LIDYA SUMIKO MORIMOTO MARTINEZ
SECRETARIO: ALIESHA ARACELI GONZALEZ ARENAS
1er. SUPLENTE: CAROLINA GUZMAN ARRIAGA
2do. SUPLENTE: MARISOL DE LA FUENTE GRANADA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio C-138, Edificio C del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental.

Asesor del tema: Dra. Aliesha
Araceli González Arenas

Supervisor técnico: M. en C
Marisol de la Fuente Granada

Sustentante: Andrea Cázares
López

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Antecedentes	4
a. Tumores Cerebrales	4
b. Clasificación molecular del glioblastoma	7
c. Modelos murinos <i>in vivo</i> de glioblastoma	8
i. Xenoinjertos	
ii. Modelos de ratones genéticamente modificados (GEMM)	
iii. Modelos murinos químicamente inducidos	
d. Ventajas y desventajas de cada modelo	14
e. Otros modelos animales de glioblastoma	15
f. Seguimiento de la progresión del cáncer	17
4. Planteamiento del problema	19
5. Hipótesis	19
6. Objetivos	20
a. Objetivo general	
b. Objetivos particulares	
7. Metodología	21
a. Cultivo de células U87-GFP	
b. Desarrollo del modelo <i>in vivo</i> de glioblastoma	
i. Implantación celular en la corteza motora de rata	
ii. Perfusión y obtención de los cerebros	
iii. Cortes coronarios del cerebro con criostato	
iv. Determinación del área dañada, migración celular e intensidad de fluorescencia.	
c. Análisis estadístico	
8. Resultados	25
a. Evaluación de la migración de la línea celular U87-GFP	25
b. Evaluación del área de daño de la línea celular U87-GFP	26
c. Medición de la intensidad de fluorescencia	27
9. Discusión	28
10. Conclusiones	35
11. Perspectivas	35
12. Abreviaturas	36
13. Referencias	38

1. RESUMEN

Los astrocitomas son los tumores cerebrales primarios más comunes que afectan al Sistema Nervioso Central. Los astrocitomas se clasifican en 4 grados con base en su malignidad y desdiferenciación, siendo el grado IV, también denominado glioblastoma (GBM), el astrocitoma de mayor mortalidad, agresividad y el de peor pronóstico, teniendo un promedio de sobrevivencia de tan solo 15 meses. El tratamiento estándar para los GBMs consiste en la extirpación quirúrgica máxima del tumor, radioterapia y quimioterapia con temozolamida, sin embargo, el 90% de los tumores recurren en el sitio de la cirugía.

El desarrollo de modelos animales ha sido una herramienta clave para la investigación del GBM humano y el desarrollo de nuevas terapias. Uno de los modelos de mayor uso para el estudio de GBM es el xenotransplante de líneas celulares derivadas de glioblastoma.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un modelo de GBM humano, con el fin de medir la migración celular, el tamaño del tumor y la densidad celular a las 2, 4 y 8 semanas después de haber realizado el xenotransplante de la línea celular U87 derivada de un GBM humano que expresa el transgen de la proteína verde fluorescente (GFP) en la corteza prefrontal de ratas Wistar inmunocompetentes. En nuestros resultados, no se observó un cambio estadísticamente significativo a ninguno de los tiempos en la migración de la línea celular U87-GFP. Sin embargo, al tiempo de 8 semanas tanto el área tumoral como la densidad celular habían disminuido considerablemente. Finalmente, estos resultados aportan datos relevantes al modelo animal acerca del tiempo al cuál las células de glioblastoma humano U87 xenotransplantadas en la corteza prefrontal de la rata, proliferan y desarrollan una masa tumoral.

2. INTRODUCCIÓN

Los astrocitomas son tumores cerebrales derivados de astrocitos, progenitores gliales o células troncales cancerosas que afectan al SNC del humano adulto. Estos tumores gliales los podemos clasificar según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 4 grados histológicos (I-IV) definidos por grados crecientes de desdiferenciación, anaplasia y malignidad. El astrocitoma grado IV, también denominado glioblastoma (GBM), es el más común, letal y es el de peor pronóstico (Louis et al. 2016). El GBM tiene una incidencia anual de 6 a 7 por cada 100,000 habitantes y es más común en hombres que en mujeres presentándose el diagnóstico entre los 45 y 70 años de edad (Ohgaki and Kleihues 2005; Ostrom et al. 2015). En México, éstas neoplasias del SNC representan el 45.7% de todos los gliomas (Lopez-Gonzalez and Sotelo 2000) y presentan una incidencia de 3.5 por cada 100,000 habitantes (Wegman-Ostrosky et al. 2016). La edad promedio de diagnóstico en México se presenta a los 45.7 años de edad afectando principalmente los hemisferios cerebrales (Wegman-Ostrosky et al. 2016).

El GBM se caracteriza histológicamente por una alta celularidad, alta actividad mitótica, proliferación vascular y necrosis tipo pseudopalisada (Olar and Aldape 2014). Además, son altamente invasivos y se infiltran en el parénquima cerebral circundante; sin embargo, generalmente están confinados al sistema nervioso central (SNC) y no producen metástasis (Omuro 2013).

Los tratamientos estándar como la neurocirugía y la radioterapia e incluso la quimioterapia son poco exitosos, ya que solo logran una ligera prolongación de la sobrevivencia del paciente (Osoba, 2000). Actualmente el desarrollo de nuevas terapias efectivas para tratar a los GBM humanos dependerá principalmente de un mejor conocimiento de la patogenia molecular de estos tumores junto con la generación de modelos animales apropiados capaces de reproducir las características clínicas, histológicas y moleculares de estos tumores. En los últimos años, se han utilizado varios modelos animales de tumores cerebrales, incluidos modelos de xenoinjertos, modelos de ratones genéticamente modificados (GEMM), modelos que utilizan la transgénesis (mediada por virus) de células somáticas y

modelos de ratones de GBM inducidos químicamente (Chen, 2017). Existen otros modelos como el sistema del transposón *PiggyBac* que ha sido utilizado para evaluar los efectos de diferentes mutaciones en la heterogeneidad tumoral del SNC así como en el estudio del desarrollo del tumor y en el descubrimiento de nuevos fármacos (Chen, 2017).

El modelo que aquí se describirá consiste en un xenoinjerto que utiliza células U87 derivadas de un GBM humano que expresa el transgen de la proteína verde fluorescente (GFP), dichas células provenientes de un cultivo serán implantada en la corteza motora de la rata para estudiar el desarrollo tumoral. Este modelo recapitulará el patrón de crecimiento rápido e infiltrativo que caracteriza al GBM con una alta reproducibilidad y un bajo costo comparado con otros modelos descritos.

3. ANTECEDENTES

a. Tumores Cerebrales

Los gliomas son tumores primarios que se desarrollan en el cerebro o en la médula espinal a partir de células troncales o células gliales. Se pueden clasificar según su célula de origen y la extensión de la infiltración cerebral en astrocitomas, oligodendrogliomas y ependimomas (Agnihotri et al. 2013). Como se observa en la Figura 1, en el SNC los gliomas representan aproximadamente el 72% de todos los tumores primarios, siendo el GBM (46.1%) el de mayor frecuencia (Ostrom et al. 2015). Los astrocitomas son de naturaleza heterogénea y pueden mostrar infiltración difusa de estructuras cerebrales adyacentes y distantes (Louis et al. 2016).

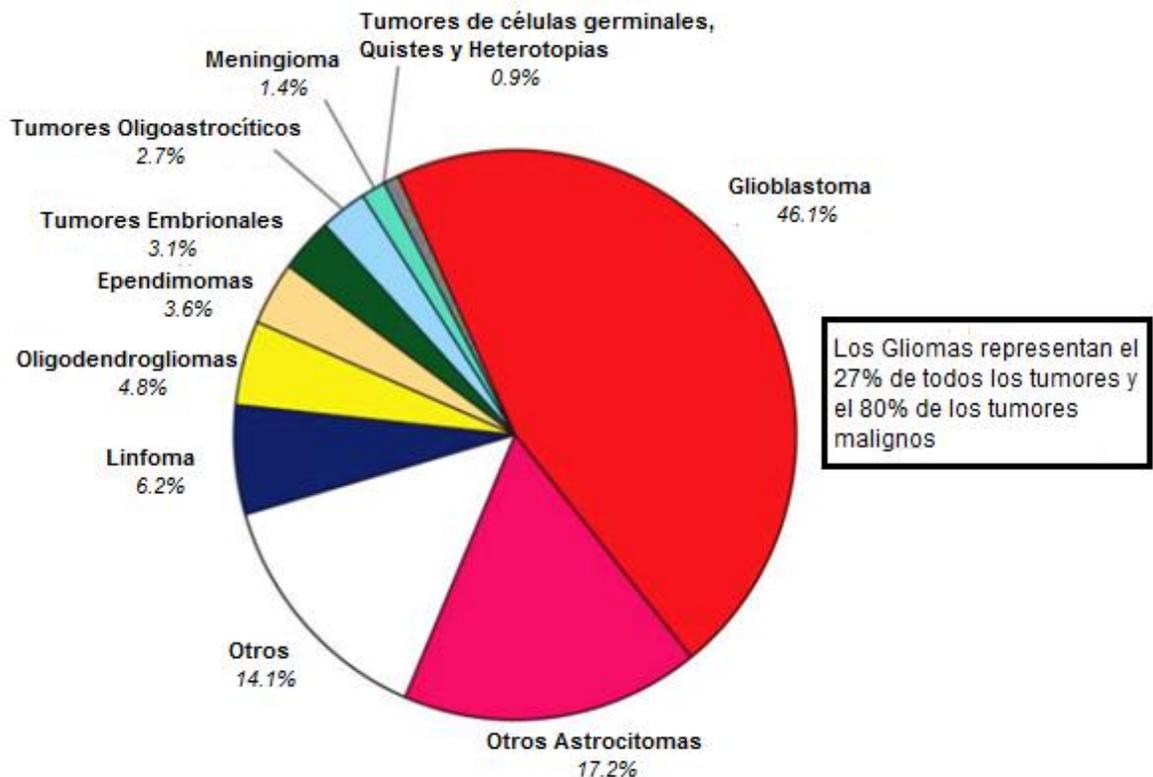


Figura 1. Tumores del SNC. Modificado de (Ostrom et al. 2015)

Según los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), estas neoplasias se pueden clasificar histológicamente en cuatro grados (Louis et al. 2016):

- Astrocitomas pilocíticos (grado I)

Los astrocitomas pilocíticos representan aproximadamente el 5-6% de todos los gliomas, con una incidencia anual de 0.37 casos por cada 100 mil personas (Ostrom et al. 2015). Los astrocitomas grado I son tumores benignos, bien delimitados, de crecimiento lento, suelen ser quísticos y se presentan generalmente en niños y adultos jóvenes. Histológicamente, este tipo de tumor, está compuesto por porciones variables de células bipolares compactas y células multipolares laxas, con microquistes y cuerpos granulares. Afecta comúnmente al nervio óptico, quiasma óptico, hipotálamo, tálamo, ganglios basales, hemisferios cerebrales, cerebelo y tronco cerebral. La resección quirúrgica total de un astrocitoma pilocítico solamente está limitada por la proximidad del tumor a alguna estructura crítica, por lo cual es la estrategia terapéutica principal. En la mayoría de los casos donde el tumor ha sido extraído total o parcialmente, las probabilidades de una supervivencia mayor a 20 años son de más del 85% (Tihan and Bloomer 2010).

- Astrocitoma difuso (grado II)

Estos tumores representan el 8-9 % de los gliomas (Ostrom et al. 2015), se caracterizan por un crecimiento lento e infiltración en estructuras cerebrales vecinas. Es común que afecte adultos jóvenes con un pico de incidencia entre los 30 y 40 años y tiende a evolucionar en forma maligna a astrocitoma anaplásico y GBM (Louis et al. 2016). Histológicamente está compuesto por astrocitos fibrilares bien diferenciados. Las células tumorales se pueden acumular bajo la piamadre o alrededor de neuronas dañadas (satelitosis).

Se puede localizar en cualquier región del SNC, con una mayor frecuencia en los hemisferios cerebrales, tallo cerebral y médula espinal. El tratamiento puede incluir resección quirúrgica, quimioterapia y/o radioterapia y el promedio de

supervivencia después de la intervención quirúrgica va de 6 a 8 años (Arko et al. 2010).

- Astrocitoma anaplásico (grado III)

Este tipo de tumor representa el 6 % de los gliomas (Ostrom et al. 2015) y puede surgir a partir de un astrocitoma difuso o manifestarse *de novo* sin la presencia de un precursor. Se caracteriza por tener una alta actividad mitótica, atipia nuclear y lesiones infiltrantes difusas, sin presentar proliferación vascular (Tihan and Bloomer 2010). Se localizan preferentemente en los hemisferios cerebrales y el promedio de edad de los pacientes es de 40 años. La media de supervivencia es de 2 a 3 años y generalmente está determinado por el tiempo requerido para la progresión a un tumor de grado IV (Arko et al. 2010).

- Glioblastoma (grado IV)

Este tumor representa el 55% de todos los gliomas, es por lo tanto el más común (Ostrom et al. 2015); se puede generar a partir de un astrocitoma difuso o anaplásico, sin embargo, lo más frecuente es que aparezca *de novo*. Comparado con otros gliomas, el GBM tiene un crecimiento infiltrativo muy rápido. Este tumor se caracteriza histológicamente por presentar células pleomórficas, atipia nuclear, actividad mitótica, trombosis vascular, necrosis tipo pseudopalisada y proliferación microvascular (Figura 2) (Olar and Aldape 2014). La edad promedio de diagnóstico se presenta entre los 45 y 70 años y afecta principalmente los hemisferios cerebrales (Figura 3). Los principales síntomas que presentan los pacientes con glioblastoma son dolores de cabeza, náuseas, cambios cognitivos, cambios en la personalidad, debilidad motora, afasia, incontinencia urinaria, defecto en el campo visual y convulsiones (Omuro 2013). La terapia estándar actual para tratar el GBM incluye la resección quirúrgica máxima del tumor, seguida de radiación y administración conjunta de temozolamida (TMZ), un agente alquilante oral (Paolillo M., et al., 2018). Sin embargo, el pronóstico para el GBM sigue siendo muy pobre, teniendo una mediana de supervivencia de tan solo 14.6 meses cuando el tratamiento es conjunto con quimio y radioterapia (Minniti et al. 2008). Por tal motivo,

existe una gran necesidad de tratamientos más efectivos que puedan aumentar la esperanza de vida de los pacientes con este tipo de tumores.

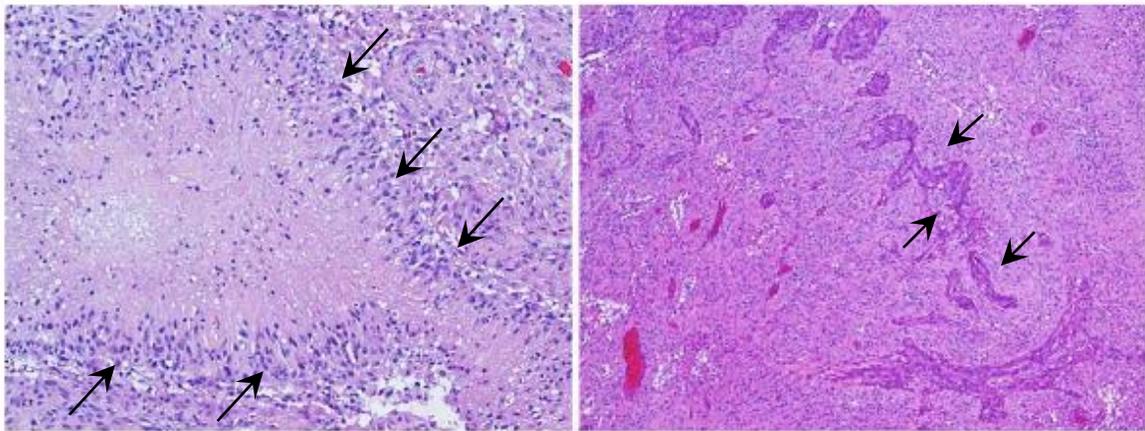


Figura 2. Histopatología del glioblastoma (GBM). Proliferación de células atípicas con actividad mitótica y necrosis tipo pseudopalizada (izquierda). Proliferación microvascular (derecha). Tomado de (Olar and Aldape 2014).

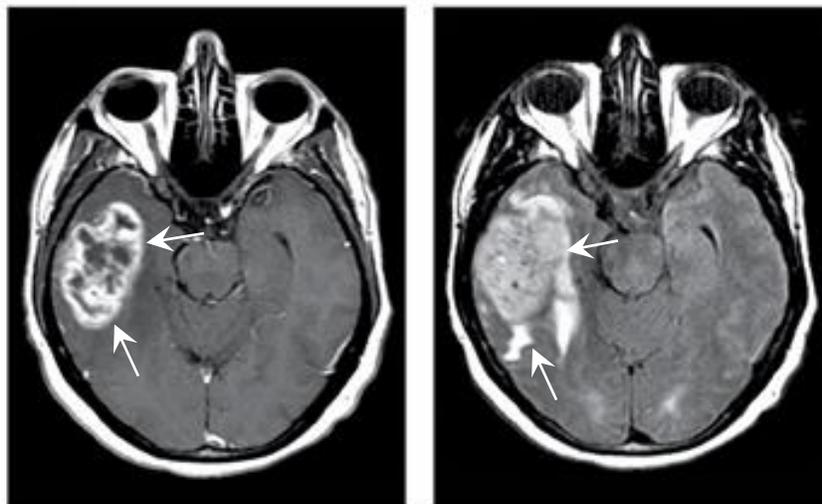


Figura 3. Imágenes de resonancia magnética cerebrales de un paciente con un glioblastoma en el lóbulo temporal derecho. Modificado de (Omuro et. al., 2013)

b. Clasificación molecular del glioblastoma

Los GBMs se pueden clasificar en dos subtipos morfológicos idénticos según la presencia o ausencia de una lesión precursora (Olar and Aldape 2014). El GBM primario es el tipo más común (90%); surge *de novo*, sin evidencia de alguna lesión

precursora y es común en adultos mayores. El GBM secundario se caracteriza por la progresión de un tumor preexistente de grado inferior (Parsons et al. 2008). Las alteraciones genéticas que presenta el GBM primario son: la mutación y amplificación del gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), la mutación en la fosfatasa tensina homóloga (PTEN) y la pérdida del cromosoma 10q, mientras que en el GBM secundario con frecuencia se pueden encontrar mutaciones de p53, mutaciones de isocitrato deshidrogenasa 1 (IDH1), mutación o amplificación de EGFR y pérdida del cromosoma 19p (Olar and Aldape, 2014; Paolillo M., et al., 2018). Además, mediante análisis de expresión de RNA mensajero (mRNA), se han identificado cuatro subtipos de GBM: clásico, pro-neural, neuronal y mesenquimal. Cada uno de estos, tienen sus propios patrones de progresión, supervivencia y respuesta a la terapia (Parsons et al. 2008). Las características moleculares de cada uno de estos subtipos se enlistan en la figura 4.

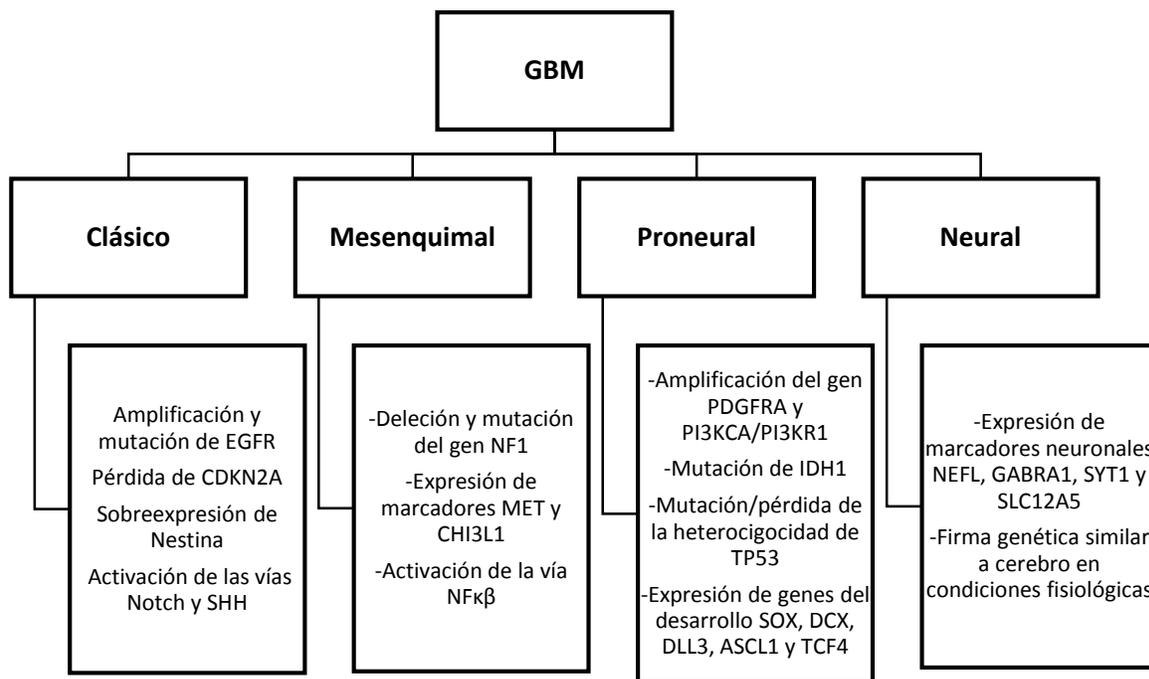


Figura 4. Clasificación molecular del glioblastoma. Modificación de (Agnihotri et al. 2013; Verhaak et al. 2010)

c. Modelos murinos *in vivo* de glioblastoma

La mayor parte del conocimiento actual que tenemos sobre el cáncer y de cuáles son sus características se ha basado en el establecimiento de líneas celulares tumorales cultivadas *in vitro* a largo plazo y su posterior inoculación *in vivo* en ratones. El ratón de laboratorio (*Mus musculus*) se considera un excelente modelo para la investigación del cáncer debido a su pequeño tamaño, facilidad de mantenerlo en cautiverio, una vida útil de 3 años, amplias similitudes fisiológicas y moleculares con los humanos y un genoma totalmente secuenciado (Frese and Tuveson 2007).

Los modelos murinos de glioma *in vivo*, han jugado un papel muy importante para desarrollar nuevas terapias y tratamientos más efectivos contra los GBMs. En estudios preclínicos su uso es una parte esencial para el desarrollo de nuevos fármacos, los cuales deben probarse en modelos animales antes de llegar a terapias experimentales en pacientes. También se han usado para analizar la biología del GBM, identificar nuevos blancos terapéuticos y evaluar el potencial de nuevas estrategias terapéuticas (De Vleeschouwer, 2017; Oh T. et al., 2014). Actualmente podemos clasificar a los modelos murinos de GBM en tres categorías principalmente: modelos de trasplante de xenoinjerto, modelos genéticamente modificados (GEMM) y modelos inducidos químicamente (Huszthy et al. 2012).

i. Xenoinjertos

El modelo de xenoinjerto es uno de los más ampliamente usados en la investigación de tumores cerebrales. En un estudio realizado por Gengenbacher y colaboradores (Gengenbacher et al. 2017), observaron que el 82% de los estudios oncológicos ocuparon el modelo de ratón de xenoinjerto derivado de líneas celulares. Aunque en la actualidad ningún modelo de astrocitoma recapitula completamente las características biológicas de la enfermedad humana, los modelos de xenoinjerto están bien establecidos para estudiar los mecanismos que determinan la formación, el crecimiento y la progresión tumoral (Biasibetti et al. 2017). En estos modelos, las células tumorales humanas (líneas celulares o derivadas de tumores de pacientes) son cultivadas en medios de crecimiento

suplementado con suero para su posterior implantación, por lo general, en animales inmunosuprimidos o inmunodeficientes. Existen dos tipos de modelos de xenoinjerto: heterotópicos, en los cuales las células tumorales son implantadas en el ratón en un sitio diferente al órgano de origen de las células, normalmente vía subcutánea (flancos del ratón), u ortotópicos, en donde las células tumorales son implantadas en el órgano de origen, en este caso intracranealmente como el tumor original (Stylli et al. 2015).

Los modelos que utilizan xenoinjertos de GBM humano utilizan principalmente líneas celulares derivadas de GBM (U87, U251, T98G y A172). Este modelo tiene la ventaja de tener un alto porcentaje de aceptación del injerto, tener una buena tasa de crecimiento y desarrollo tumoral, buena reproducibilidad, crecimiento y progresión de la enfermedad, a un bajo costo y con un fácil manejo. Sin embargo, estudios han demostrado que los xenoinjertos de líneas celulares de GBM no reflejan del todo las características clínicas de los tumores primarios debido a la pérdida de heterogeneidad genética y a los cambios que sufren las células en la expresión génica por la propagación *in vitro* a largo plazo (Daniel et al. 2009).

En segundo lugar, se utilizan los xenoinjertos de células tumorales derivadas de pacientes (PDX), los cuales consisten en transplantar células tumorales, obtenidas de biopsias de tumores humanos en ratones inmunodeficientes. Estos modelos en el campo de la investigación del cáncer sólo se han empleado en un 7% según un estudio en el 2016 (Gengenbacher et al. 2017). En el caso de los PDX, se ha demostrado que conservan de manera estable las características moleculares, genéticas e histológicas del tumor cerebral del que se deriva cuando se implantan en roedores inmunodeficientes, con una limitada expansión en cultivos *in vitro* (Gengenbacher et al. 2017). Los PDX también tienen la ventaja de que al derivarse de un tumor humano, se puede predecir fielmente la respuesta terapéutica de fármacos clínicamente aprobados, siendo éstos una herramienta prometedora para la medicina personalizada (Girotti et al., 2016; Morelli, 2014).

Las ventajas de los xenoinjertos de GBM son su tumorigénesis eficiente, sus tasas de crecimiento reproducibles y relativamente rápidas así como el

conocimiento exacto de la ubicación del tumor. También es posible observar la infiltración de células tumorales en todo el parénquima cerebral circundante reflejando así algunas de las características histopatológicas del GBM humano según lo descrito por la OMS (Louis et al. 2016). Debido a que comúnmente estos modelos se hacen en animales inmunodeficientes, tienen la desventaja de no reproducir la respuesta inmune de la enfermedad, que puede ser relevante en la evaluación de la terapia (Huszthy et al. 2012). Sin embargo, los xenoinjertos que usan ratones NOD / SCID que han sido “humanizados” mediante la inyección de sangre periférica o células de médula ósea, permiten una reconstitución parcial de la respuesta inmune del tumor (Richmond and Su 2008) pero es una técnica más cara y complicada. Además, otra desventaja del modelo, es el inicio de la tumorigénesis mediante la implantación de las células tumorales (heterotópico u ortotópico) que no se parece a la patogénesis de la enfermedad humana, que se piensa surge a partir de una sola célula cancerosa (Stylli et al. 2015).

ii. Modelos de ratón genéticamente modificados (GEMM)

Con los avances de la tecnología de la biología molecular de los últimos años, ha sido posible la generación de diversos modelos genéticos de cáncer más sofisticados. Estos avances han hecho que los modelos de ratón genéticamente modificados (GEMM por su siglas en inglés “Genetically Engineered Mouse Models”) sean actualmente el segundo modelo de ratón más común en la investigación oncológica (Gengenbacher et.al. 2017). Los GEMM de GBM permiten la formación de tumores *de novo* a partir de un perfil genético alterado en los ratones, en un microambiente inmunológicamente activo y teniendo la capacidad de reproducir las características moleculares, histopatológicas y biológicas de sus homólogos humanos (Ciezka et al. 2016; Stylli et al. 2015). Estos modelos implican la manipulación del material genético del ratón para mutar, eliminar o sobreexpresar uno o varios oncogenes o genes supresores de tumores que están implicados en las vías de señalización alteradas para el glioblastoma humano. Dentro de esas vías de señalización podemos encontrar Akt, Ras, PTEN, TP53, NF1, PI3K, EGFR y Rb, entre otras (Viotti et al. 2014). Esto se logra ya sea mediante la modificación

de la línea germinal (células específicas en un tiempo determinado) o la transducción de células somáticas mediante vectores virales (retrovirus o adenovirus) (Agnihotri et al. 2013; Chen et al. 2017; Chen et al. 2014). La metodología CRISPR/Cas se ha utilizado para inducir mutaciones de pérdida de función de varios genes supresores de tumores involucrados en el GBM con una alta incidencia tumoral (Zuckermann et al. 2015). Para generar un modelo de GBM, Holland y colaboradores, utilizaron el virus de leucosis de sarcoma aviar recombinante (ASLV) para transferir el gen mutado de EGFR a células gliales y astrocitos en el tejido murino que expresan el receptor para dicho retrovirus (ASLV). Ellos demostraron que la expresión constitutiva de EGFR mutado en las células gliales, inducía lesiones tumorales con muchas similitudes al GBM humano (Holland et al. 1998). Esta metodología, tiene la posibilidad de dirigirse de forma simultánea al cerebro con varios oncogenes o genes supresores de tumores (Frese and Tuveson 2007).

Este modelo es muy útil para evaluar los efectos de la mutación, delección o amplificación génica específica de uno o más genes implicados tanto en la iniciación como en la progresión tumoral, siendo muy útiles para evaluar la eficacia de la terapia y evaluar los mecanismos de resistencia a los medicamentos. Debido a que los modelos GEMM desarrollan tumores *de novo* en un contexto inmunológico intacto, es una gran herramienta para poder investigar el potencial de la inmunoterapia, así como para analizar el papel del microambiente en la biología tumoral (Kersten et al. 2017). Sin embargo, a pesar de los muchos atributos que tiene, los modelos GEMM no pueden reproducir completamente la complejidad genética de los tumores humanos y tienen tres desventajas principalmente. Una de las desventajas de este modelo es que en la mayoría de estos no es posible reflejar la heterogeneidad intratumoral del glioblastoma al tener células homogéneas y con cambios genéticos específicos. Además, en los modelos de GEMM al no poderse controlar el inicio del tumor, el tiempo de desarrollo no es altamente reproducible como en otros modelos (De Vleeschouwer, 2017). Por último, el desarrollo y la validación de estos modelos es muy costoso, laborioso y requiere de mucho tiempo.

iii. Modelos químicamente inducidos

Los modelos de GBM de ratón, inducidos químicamente, han sido una herramienta indispensable para la investigación de los GBMs. Estos modelos se desarrollan a partir de una lesión precursora que se convierte en un glioma murino químicamente inducido (9L, C6, GL261, CT-2A y CNS-1) con agentes alquilantes de ADN conocidas como nitrosoureas (Oh T. et al., 2014). Dichos modelos imitan el crecimiento del GBM humano con la ventaja de analizar también la inmunología del GBM debido a que estos tumores se presentan en un huésped inmunocompetente singénico, es decir, el tumor tiene el mismo trasfondo genético del ratón (De Vleeschouwer, 2017; Stylli et.al. 2015). GL261 es uno de los modelos de tumores cerebrales murinos mejor caracterizados que existen en la actualidad, siendo ampliamente usado en la investigación preclínica de inmunoterapias (Oh T. et al., 2014). GL261 es una línea celular de glioma murino inducida químicamente con 3-metilcolantreno que tiene características de crecimiento similares al GBM humano cuando se implantan en el cerebro de ratones singénicos inmunocompetentes. Las células GL261 presentan un fenotipo difuso infiltrante e invasivo, replican características morfológicas importantes como neovascularización, figuras mitóticas y necrosis (Clark et al. 2016) además, expresan marcadores tales como GFAP y S100 (Kovacs et al. 2014). Cuando las células GL261 se implantan intracranealmente en dichos ratones, el modelo tiene la ventaja adicional de mantener un microambiente inmunológico intacto para la investigación de mecanismos inmunológicos involucrados en el GBM (Ksendzovsky et al. 2009).

A pesar de su relevancia biológica, los modelos inducidos químicamente actualmente se utilizan solo el 6% en la investigación del cáncer (Gengenbacher et.al. 2017) y específicamente en GBM en un muy bajo porcentaje. La latencia prolongada para la formación de los tumores y la alta variabilidad en el desarrollo tumoral son de las principales dificultades que tiene este modelo (Szatmári et al. 2006).

d. Ventajas y desventajas de cada modelo

Los modelos murinos han sido indispensables para el estudio de la gliomagénesis, progresión del glioma y el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos. Un modelo animal ideal para el GBM humano debería reproducir las principales características de ésta neoplasia. El modelo, en general, debe mostrar semejanza histológica, así como similitud genética con el GBM humano, debe ser ortotópico, mostrar un crecimiento tumoral invasivo y angiogénico sin encapsulación y en general, ser no inmunogénico (Szatmári et al. 2006). También debe ser altamente reproducible con crecimiento tumoral predecible, imitando la respuesta terapéutica del glioblastoma humano. Sin embargo, actualmente ningún modelo simula completamente las características genómicas y fenotípicas del tumor humano. Como pudimos observar, todos los modelos descritos en esta sección tienen deficiencias que van a limitar su uso en la investigación del GBM. El conocimiento de dichos modelos y de cuáles son sus fortalezas y limitaciones permitirá obtener mejores resultados según sea el objetivo del estudio. En la tabla 1 se enlistan como resumen las ventajas y desventajas de cada uno de los modelos anteriormente descritos:

Tabla 1. Ventajas y Desventajas de los tipos de modelos murinos de GBM

<i>Modelo</i>	<i>Ventaja</i>	<i>Desventaja</i>	<i>Referencia</i>
<i>Xenoinjerto de línea celular</i>	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Alto desarrollo y crecimiento ❖ Buena reproducibilidad ❖ Crecimiento y progresión confiable de la enfermedad 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Reproducen parcialmente características histológicas del GBM humano ❖ Se requieren ratones inmunodeficientes por lo que no reproducen la respuesta inmune ❖ Falta de iniciación tumoral espontánea 	(Marrero et al. 2014)
<i>Xenoinjerto derivado de paciente</i>	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Reproducen las características genéticas y fenotípicas del tumor original 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Se requieren ratones inmunodeficientes por lo que no reproducen la 	(Garcia et al. 2014; Richmond)

<i>Modelo de ratón genéticamente modificado (GEM)</i>	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Las células del tumor son heterogéneas ❖ Pueden ayudar a predecir la respuesta de un paciente a un tratamiento ❖ Estudio de las interacciones moleculares y celulares 	<ul style="list-style-type: none"> respuesta inmune y el microambiente tumoral ❖ Bajo porcentaje de injerto (desarrollo) ❖ Crecimiento lento ❖ Falta de iniciación tumoral espontánea 	and Su (2008)
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Es posible identificar eventos moleculares encargados del inicio y la progresión tumoral ❖ Reproducen patrones genéticos específicos del GBM primario ❖ Analizar el papel del microambiente tumoral ❖ Puede establecerse en animales inmunocompetentes 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ No se refleja por completo la heterogeneidad intratumoral ❖ Mala reproducibilidad ❖ Predicción relativamente baja a la respuesta terapéutica de fármacos ❖ Baja incidencia tumoral y latencia prolongada para la formación de tumores ❖ Alto costo y tiempo para desarrollarlos (requieren años de trabajo antes de validarlos) 	(Chen et al. 2017; Ciezka et al. 2016)
<i>Modelos inducidos químicamente</i>	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Los roedores conservan un sistema inmune intacto ❖ Excelente para estudiar la inmunología tumoral y estrategias inmunoterapéuticas ❖ Contienen varias alteraciones biológicas moleculares características de los gliomas humanos 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Se considera que puede ser diferente al glioblastoma humano ❖ Variación en el tiempo de inducción, tipo de tumor maligno y ubicación de los tumores 	(Clark et al. 2016; Szatmári et al. 2006)

e. Otros modelos animales de glioblastoma

Se han empleado otros modelos animales para el estudio del cáncer como son el modelo canino, el pez cebra y *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta). El modelo canino ha sido atractivo para estudiar los tumores cerebrales y probar en ellos nuevos tratamientos terapéuticos para el GBM debido a su relación evolutiva más estrecha con el ser humano, su mayor tamaño cerebral en comparación con los roedores y su similitud en la biología tumoral con el humano (Chen et al. 2013).

En los modelos de astrocitomas caninos, dos de las mutaciones importantes asociadas a los astrocitomas humanos (TP53 y EGFR) se expresan en un nivel aberrante en 35% para TP53 y 23% para EGFR, lo cual es consistente con la enfermedad humana (Chen et al. 2013). Actualmente, el modelo canino para la investigación de tumores cerebrales emplea solo el modelo espontáneo, exhibiendo las mismas anomalías patológicas, moleculares, clínicas y características de neuroimagen que sus homólogos humanos (Hicks, et.al., 2017). A pesar de que el modelo canino tiene gran potencial para la investigación de la patogénesis del cáncer, los desafíos técnicos, el mayor costo, dilemas éticos y menor disponibilidad de animales en comparación con los modelos murinos puede limitar el uso de estos modelos.

El uso del pez cebra como modelo animal en la investigación del cáncer proporciona varias ventajas, tales como su rápido desarrollo, alta fertilidad, es susceptible a manipulación genética y su tamaño es pequeño y fácil de criar. Además, los embriones y las larvas son transparentes, por lo que el desarrollo del tumor (angiogénesis y proliferación) en etapas tempranas se puede visualizar fácilmente al microscopio (Idilli et al. 2017). El 71,4% de los genes humanos tienen al menos un ortólogo con el pez cebra, lo que podría conferirle una buena similitud con la enfermedad humana. Sin embargo, como en todos los modelos, existen algunas limitaciones como son la presencia de muchos genes duplicados, que pueden complicar la manipulación genética y la temperatura a la que se tiene que trabajar (28°C), que es inferior a la temperatura óptima de las células de mamíferos (Mione and Trede 2010). Además de esto, comercialmente no hay anticuerpos que reconozcan las proteínas del pez cebra, lo que complica los estudios proteómicos. Las estrategias para reproducir el crecimiento espontáneo de glioma en el pez cebra incluyen modelos genéticamente modificados, modelos transgénicos y de xenotrasplantes (Idilli et al. 2017).

Para investigar la base genética de los gliomas malignos, Read y colaboradores (Read et al. 2009) desarrollaron un modelo de glioma en la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, en donde observan que la activación

constitutiva de las vías de señalización EGFR-Ras y PI3K (comunes en ésta enfermedad) en células gliales y precursores gliales dan lugar a células neoplásicas altamente proliferativas e invasivas, que tienen un crecimiento tumoral trasplantable, imitando el glioblastoma humano (Read et al. 2009).

f. Seguimiento de la progresión del cáncer en modelos animales

Una vez desarrollado y escogido el mejor modelo, un desafío importante es poder darle seguimiento al desarrollo tumoral del mismo. Sabemos que los astrocitomas malignos tienen la capacidad de infiltrarse de manera difusa en el tejido cerebral circundante, sin embargo, en muchas ocasiones es difícil identificar con certeza las células tumorales infiltrantes en los modelos experimentales de estas neoplasias.

Técnicas no invasivas de imagenología, como imágenes de resonancia magnética (MRI) e imágenes de bioluminiscencia (BLI) han sido ampliamente utilizadas para evaluar modelos animales de distintas neoplasias malignas, específicamente en GBM, ya que permiten la evaluación de la progresión de la enfermedad y el efecto terapéutico a algún tratamiento en el animal (Biasibetti et al. 2017; Ciezka et al. 2016; Garcia et al. 2014). La técnica de BLI tiene una alta sensibilidad y consiste en inocular a los ratones con células tumorales que expresan luciferasa de forma estable para posteriormente inyectar D-luciferina. La enzima de luciferasa cataliza la oxidación de D-luciferina produciendo una emisión de luz que será transformada en una señal y detectada con una cámara con dispositivo de carga acoplada (CCD) (Inoue et al. 2007). La resonancia magnética (MRI) puede proporcionar imágenes tomográficas que muestran información morfológica detallada. Esta metodología, ampliamente usada en el desarrollo de modelos de GBM, permite la visualización de los órganos internos, localización de las lesiones y la medición del tumor así como la respuesta al tratamiento (Garcia et al. 2014; Goldbrunner et al. 2000). A pesar de las ventajas que tienen estas técnicas, el equipo requerido y la metodología pueden llegar a ser de mayor complejidad.

Otra de las técnicas utilizadas para dar un seguimiento a la progresión del tumor es el uso de líneas celulares que expresan fusiones con proteínas

fluorescentes. Esta metodología ha aumentado en los últimos años debido a los avances en la microscopía de fluorescencia (Spector and Goldman 2010). La proteína GFP es un péptido de 238 aminoácidos proveniente de la medusa bioluminiscente *Aequorea victoria* que absorbe a 395 nm (azul) y emite a una longitud de onda de 540 nm (luz verde) sin la necesidad de cofactores o sustratos adicionales (Chalfie et al. 1994). La GFP se utiliza para estudiar la expresión génica y la localización de proteínas, así como para etiquetar estructuras dentro de la célula. Esto ayudará a analizar, cuantificar y visualizar diversos procesos celulares, ya sea en una sola célula o en un tejido (Jung et al. 2001). El método de transfección utilizado (fosfato de calcio, electroporación, lipofectamina, adenovirus, lentivirus, entre otros) y el tipo celular con el que se trabaje van a determinar si la transfección se realiza de manera estable o transitoria.

Las líneas celulares que expresan la proteína GFP han sido utilizadas en un amplio rango de estudios de procesos celulares, incluyendo, señalización, dinámica del citoesqueleto, actividad de proteínas cinasas, estructura de la cromatina, tráfico de proteínas y localización (Thomas et al. 2005). Anteriormente, ya se ha realizado con éxito la transfección de la proteína GFP en líneas celulares de astrocitomas humanos (U87-MG y U343-MG) (Jung et al. 2001) y en el trabajo realizado por Fillmore y colaboradores, demuestran que la transfección estable de las células de glioblastoma con GFP no altera las características de crecimiento *in vitro* o la capacidad de formar tumores *in vivo* (Fillmore et al. 1999).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El pronóstico de vida para los pacientes con GBM es muy pobre (aproximadamente 15 meses) teniendo una alta recurrencia tumoral en el sitio de la cirugía. Además, debido a que el GBM también es resistente a terapias de radiación y quimioterapia, es necesario el desarrollo de nuevos tratamientos contra el GBM. La disponibilidad de modelos experimentales que reproduzcan la enfermedad humana es indispensable para la investigación de nuevos enfoques terapéuticos. Por tal motivo, en este trabajo se desarrolló un modelo *in vivo* de GBM. Lo anterior consistió en la implantación estereotáxica de células previamente cultivadas de la línea celular U87 que contiene el transgen de la proteína verde fluorescente (GFP), en la corteza prefrontal de la rata durante 2, 4 y 8 semanas.

5. HIPÓTESIS

Si la implantación de células derivadas de GBM humano U87-GFP en la corteza motora de rata tiene la capacidad de desarrollar un tumor, entonces se podrán analizar y cuantificar procesos involucrados en el desarrollo tumoral.

6. OBJETIVOS

a. Objetivo General

Desarrollar un modelo de GBM humano en la corteza prefrontal de la rata con el fin de estudiar procesos involucrados en la tumorigénesis.

b. Objetivos particulares

- Implantar células tumorales de la línea U87-GFP, derivadas de un GBM humano, en la corteza prefrontal de ratas de la cepa Wistar.
- Medir la migración de las células tumorales U87-GFP en la corteza motora de rata a las 2, 4 y 8 semanas de desarrollo.
- Analizar cuantitativamente el tamaño del área de daño tumoral y la intensidad de fluorescencia a las 2, 4 y 8 semanas.
- Comparar cuantitativamente si existe diferencia alguna en el desarrollo tumoral, migración celular e intensidad de fluorescencia a los mismos tiempos.

7. METODOLOGÍA

a. Cultivo de células U87-GFP

Se cultivó la línea celular U87 proveniente de un GBM de un hombre de 44 años. La línea celular se cultivó en medio DMEM con rojo de fenol suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% y 95% de humedad. El medio fue cambiado cada 48 horas hasta obtener una confluencia celular del 70-80%. Las células fueron transducidas con un vector lentiviral que codifica el transgen para la proteína verde fluorescente (GFP) en presencia de 8 mg/mL de polybrene (Sigma) durante 24 horas. Posteriormente, el medio en el que se encontraban las células fue removido y reemplazado con medio DMEM con SFB 10%. Finalmente, las células se examinaron 4 días después para observar la presencia de la GFP con ayuda de un microscopio invertido de epifluorescencia (Figuras 5 y 6).

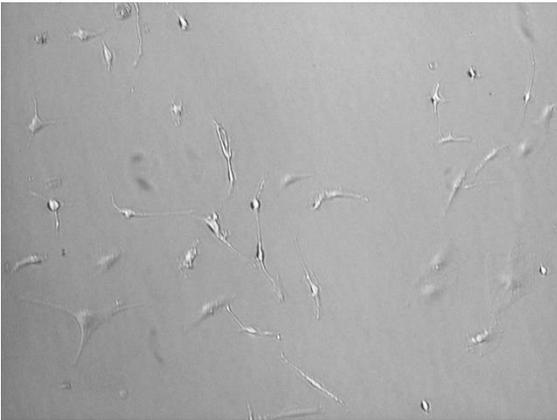


Figura 5. Células U87-GFP en campo claro. Las imágenes se muestran a un aumento de 4X (Microscopio invertido)

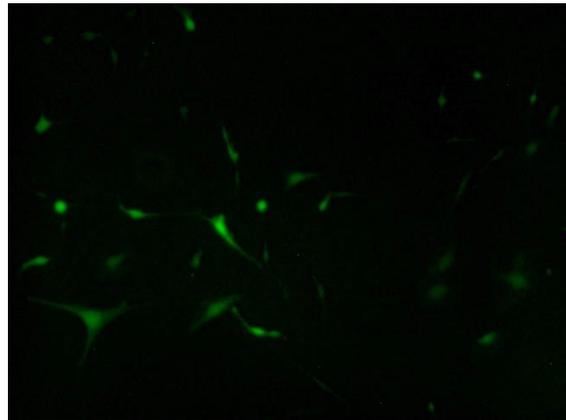


Figura 6. Células U87-GFP en campo oscuro. Las imágenes se muestran a un aumento de 4X (Microscopio invertido de epifluorescencia)

b. Desarrollo del modelo *in vivo* de glioblastoma

i. Implantación de células U87-GFP en la corteza prefrontal de rata

Para este trabajo se emplearon 15 ratas macho adultas de la cepa Wistar de 200-250 g de peso, las cuales se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad 12:12 con agua y alimento *ad libitum*. Cada rata se anestesió vía intraperitoneal con Ketamicina y Xilazina (80 y 10 mg/kg de peso, respectivamente) y se colocó en el aparato estereotáxico (Fig. 7 superior). Se desinfectó la parte superior de la cabeza de la rata con iodopovidona y se rasuró el área. Se realizó una incisión en dirección anteroposterior y se retrajo el tejido. Se goteó un poco de agua oxigenada sobre el cráneo y se raspó con el bisturí para retirar el tejido conectivo. Se localizaron las coordenadas 1.6mm anterior y 3 mm lateral izquierdo con respecto al Bregma correspondientes a la corteza cerebral motora y se realizó un trépano en dicho sitio a 2mm de profundidad. Posteriormente, se insertó una cánula conectada a una microjeringa que contenía 200,000 células resuspendidas en 2 μ L de medio DMEM y éstas se fueron inyectando a lo largo de 2 minutos a través de la cánula (Fig. 7 inferior). Se dejó reposar 5 minutos para permitir el asentamiento de las células implantadas y se extrajo la cánula. Se colocó cera para hueso suficiente para cubrir el sitio del trépano. Por último, se goteó Gentamicina sobre la superficie craneal y se suturó la piel. Finalmente, los tres días siguientes a todas las ratas se les administró vía subcutánea Dipirona (Neodip) (10 mg/kg de peso) para disminuir la inflamación y se dejaron en recuperación con agua y alimento *ad libitum*. Todos los procedimientos fueron realizados bajo el régimen del Código ético para el uso y cuidado de animales de laboratorio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía y bajo la Norma Mexicana para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

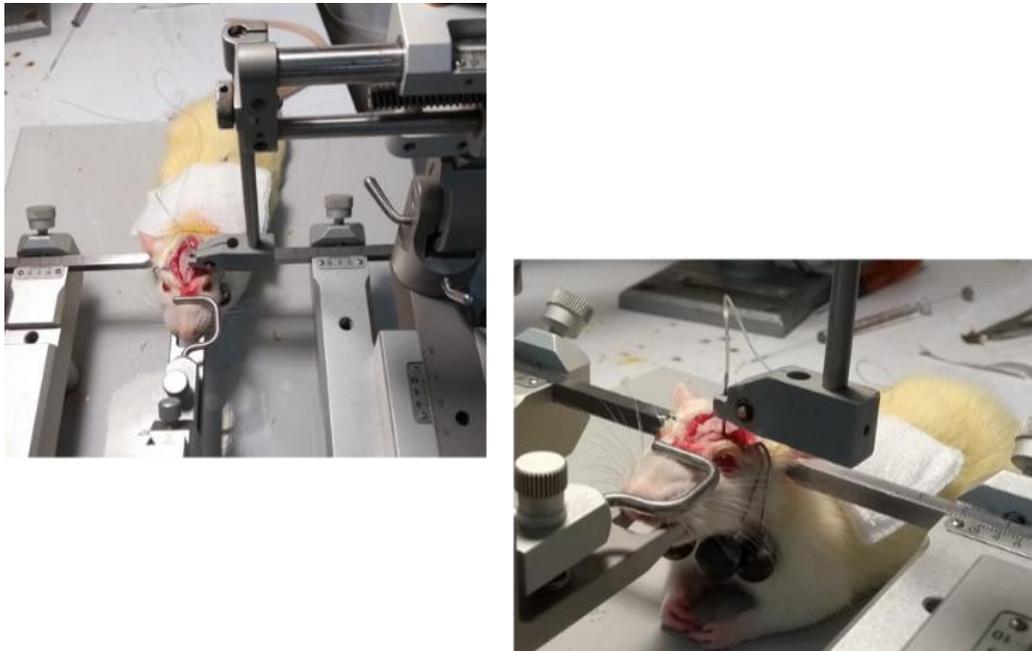


Figura 7. Implante estereotáxico de células U87-GFP en la corteza prefrontal del cerebro de la rata (Laboratorio Fisiología de la Formación Reticular, INNN)

ii. Perfusión y fijación de los cerebros

Para la perfusión, todas las ratas se dividieron aleatoriamente en tres grupos (n=5) correspondientes a 2, 4 y 8 semanas post implantación de las células tumorales. Cada rata se anestesió previamente vía intraperitoneal con Pentobarbital sódico (30 mg/kg de peso). Se realizó una incisión en la cavidad peritoneal de la rata a la altura del esternón, cortando el diafragma y las costillas para exponer al corazón. Se introdujo una cánula en el ventrículo izquierdo del corazón y se hizo un corte en la aurícula derecha de la rata. Se perfundieron con 300 mL de solución salina y consecutivamente con 300 mL de formaldehído al 3.7 %. Una vez fijados los órganos, se diseccionaron los cerebros de cada una de las ratas y se conservaron en viales con formaldehído 3.7% para su posterior procesamiento.

iii. Cortes coronales del cerebro con criostato

Una vez fijados los cerebros, se crioprotegieron por medio de gradientes crecientes de sacarosa (10%, 20% y 30%) durante 24 horas cada uno. Una vez

realizada la crioprotección, cada cerebro se envolvió en papel aluminio y posteriormente se colocó en hielo seco para su congelación. Las secciones coronales se cortaron a -26°C de temperatura y $20\ \mu\text{m}$ de grosor en un criostato. Los tejidos obtenidos en el sitio de la implantación de las células (trépano) fueron colocados con cuidado en portaobjetos cargados positivamente guardándolos en la oscuridad.

iv. Determinación del área dañada y migración celular

Para la visualización de los cortes histológicos se usó el microscopio de fluorescencia Olympus Bx43 y con la ayuda del programa Image-Pro Plus 7.0 se obtuvieron las fotografías correspondientes para medir la migración y el tamaño del tumor desarrollado a las 2, 4 y 8 semanas usando el objetivo de 10X y 40X, respectivamente.

c. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de migración celular (μm), área de daño tumoral (μm^2) e intensidad de fluorescencia se analizaron mediante una ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Tukey. Las pruebas se realizaron con un intervalo de confianza del 95%, por lo que todos aquellos valores que tuvieron una $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente diferentes. El análisis fue realizado mediante el programa Graph Pad Prism 5.0.

8. RESULTADOS

a. Evaluación de la migración de la línea celular U87-GFP

Para el desarrollo del modelo *in vivo* de GBM humano en la corteza prefrontal de la rata se midió la distancia (μm) de la migración que presentaron las células U87-GFP desde la zona de implantación (trépano, indicado con flechas blancas), hasta el final de la masa tumoral (flechas rojas). La cuantificación se realizó a las 2, 4 y 8 semanas de haber realizado el xenotransplante mediante el programa Image-Pro Plus 7.0 (Fig. 8A). Como se puede apreciar en la Figura 8B, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la migración de las células a los tiempos de 2, 4 y 8 semanas.

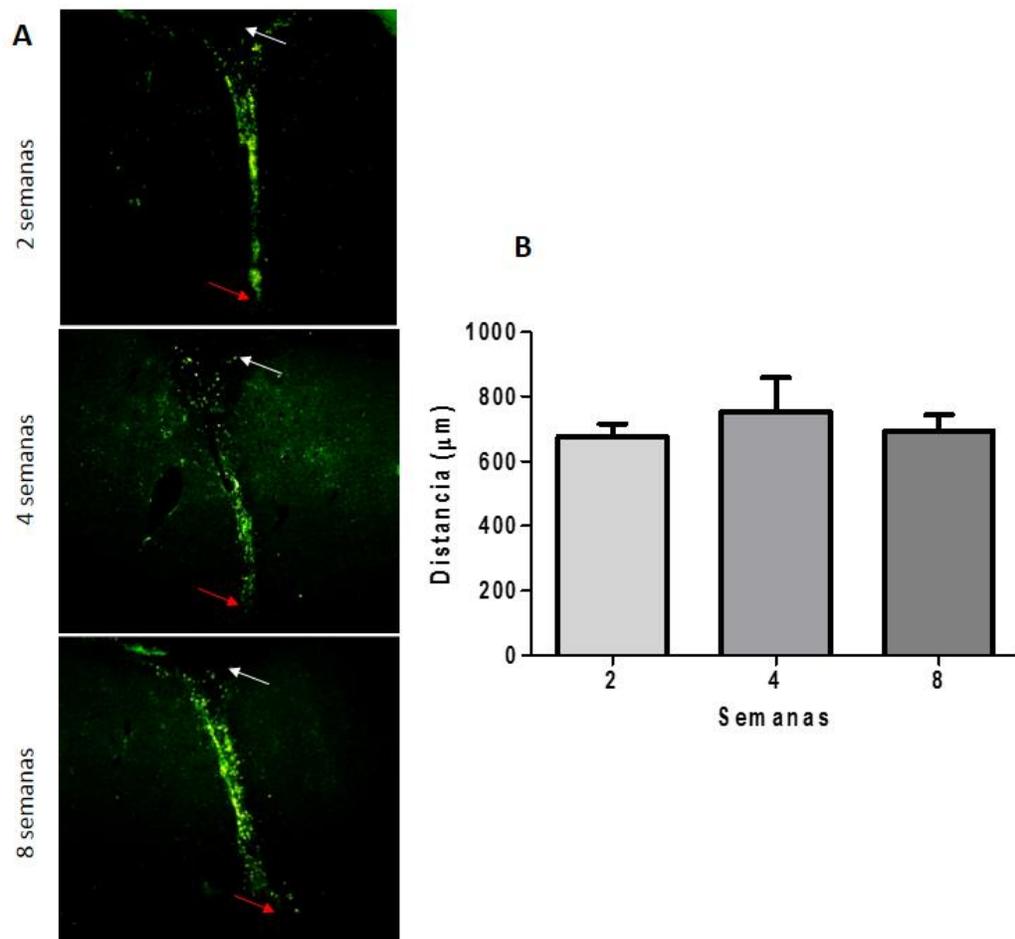
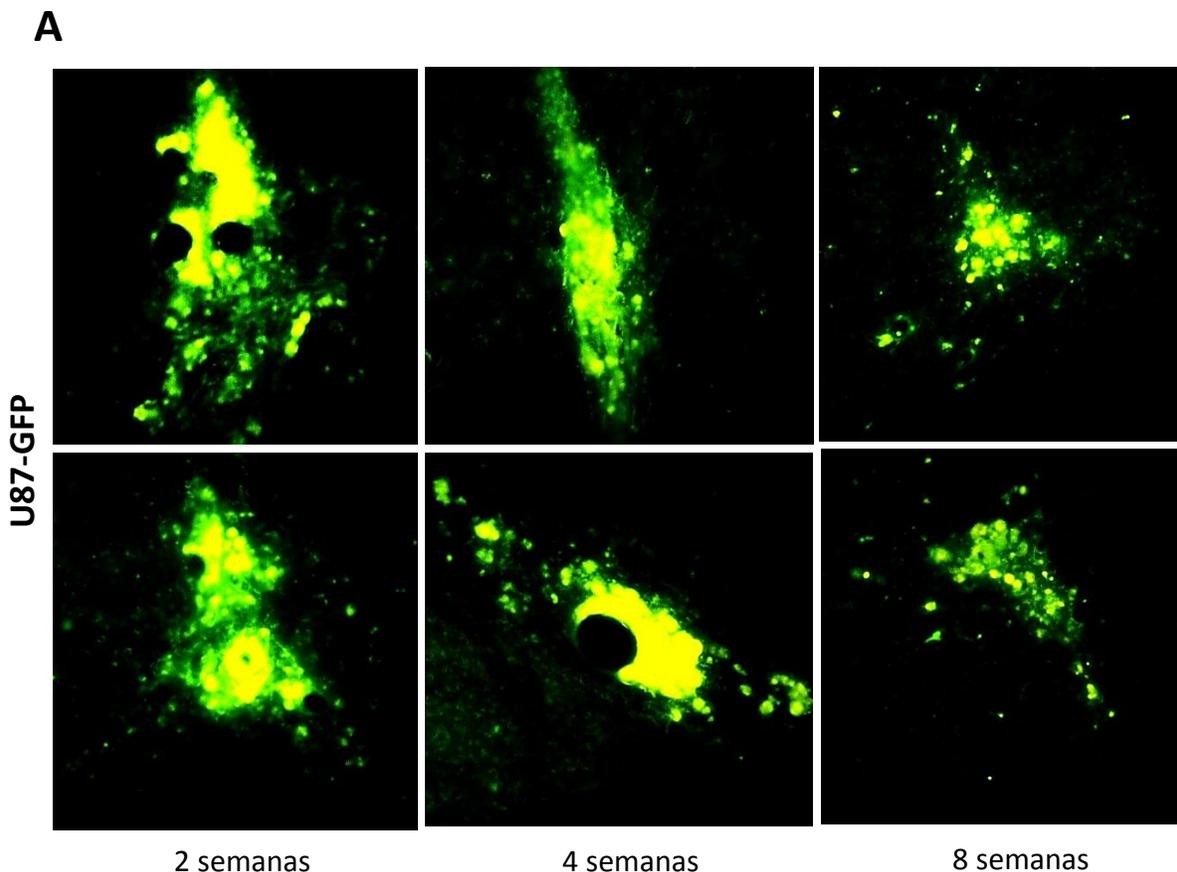


Figura 8. Migración. Imágenes representativas de la migración de las células U87-GFP a las 2, 4 y 8 semanas de implantación. Las imágenes se muestran en un aumento de 10X (A). Cuantificación de la distancia recorrida (μm) por las células U87-GFP desde la zona de implantación (trépano) hasta el final de la masa tumoral. Media \pm SEM, n=5. Análisis estadístico: ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Tukey (B).

b. Evaluación del área de daño de la línea celular U87-GFP

Para medir el área de daño provocado por las células U87-GFP se tomó en cuenta la formación de masas tumorales en varios cortes cerebrales. A continuación se muestran imágenes representativas del desarrollo del tumor a lo largo de las 2, 4 y 8 semanas en dos grupos de animales diferentes (Figura 9A). En la mayoría de los cortes se observó necrosis tipo pseudopalizada, una característica muy importante del GBM. En la Figura 9B se muestra la gráfica de la cuantificación del área dañada (μm^2) en donde se observó que a las 8 semanas de evolución del tumor existe una disminución estadísticamente significativa del área del tumor en comparación con los tumores de 2 semanas de desarrollo ($p < 0.05$, 2 vs 8 semanas de desarrollo). A pesar de que a las 4 semanas no hubo un cambio significativo en el tamaño del tumor, se puede apreciar una tendencia en la disminución del área dañada posterior a las 2 semanas (Figura 9A y 9B). Las mediciones del área tumoral se realizaron en 5-8 cortes cerebrales utilizando el programa Image J con el objetivo de 40X.



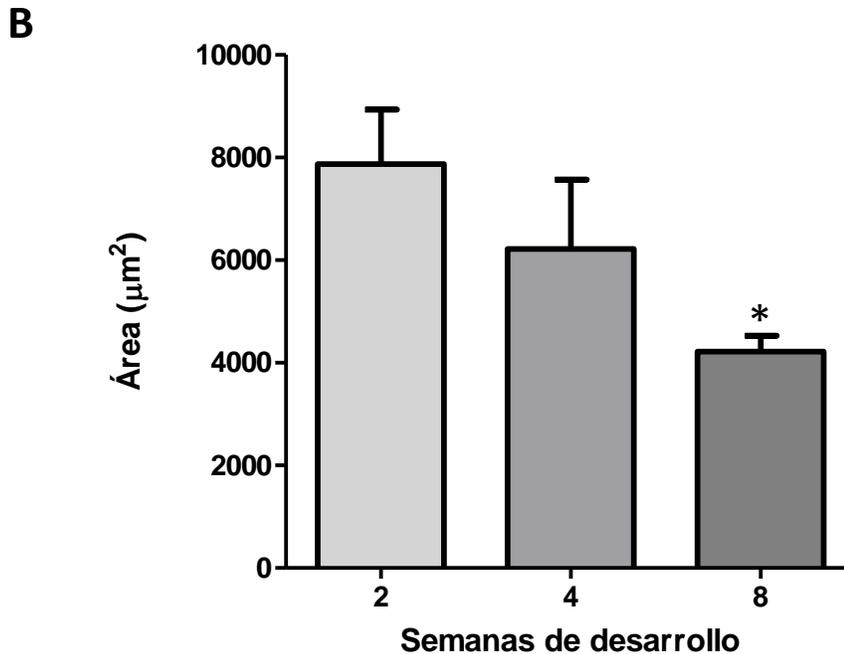


Figura 9. Área de daño. Imágenes representativas del área dañada provocada por las células U87-GFP a las 2, 4 y 8 semanas de implantación de dos grupos diferentes de animales. Las imágenes se muestran en un aumento de 40X **(A)**. Cuantificación del área dañada (µm²) por las células U87-GFP. Media ± SEM, n=5. Análisis estadístico: ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Tukey. *p<0.05, vs 2 semanas **(B)**.

c. Medición de la intensidad de fluorescencia

Para corroborar estos resultados obtenidos, se realizó la cuantificación de la intensidad de fluorescencia a los mismos tiempos con la ayuda del programa ImageJ. La intensidad de fluorescencia nos indica de manera indirecta la densidad de células tumorales presentes que expresan a la proteína verde fluorescente (GFP). A pesar de que no hubo un cambio significativo entre los grupos de 2 vs 4 semanas, se observó una disminución en la intensidad de fluorescencia. Por otro lado a las 8 semanas de desarrollo (Figura 10), existió una regresión tumoral con una disminución en las células U87-GFP con respecto a las 2 semanas muy semejante a los resultados de área dañada (Figura 9) (p<0.05, 2 vs 8 semanas).

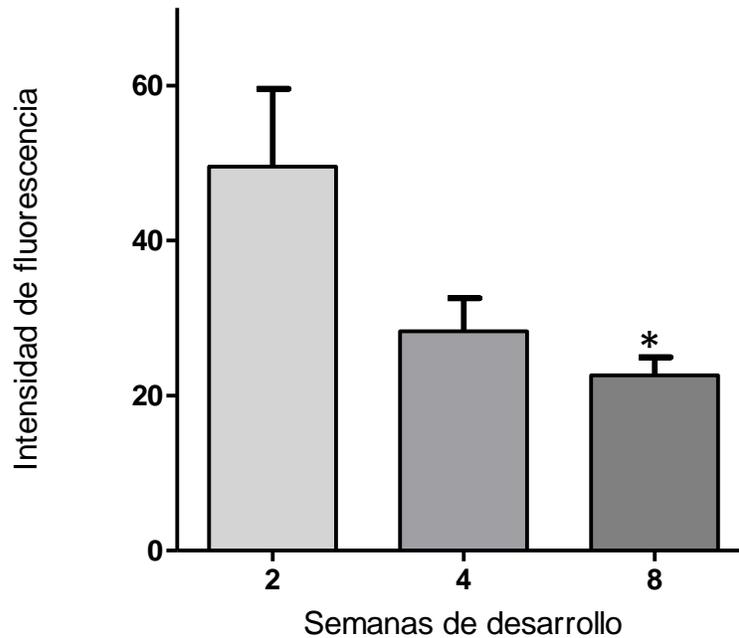


Figura 10. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de las células U87-GFP, medida indirecta de la densidad celular. Media \pm SEM, n=5. Análisis estadístico: ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Tukey. *p<0.05, vs 2 semanas.

9. DISCUSIÓN

Los modelos animales son una herramienta fundamental en la investigación del cáncer. Uno de los modelos usados por excelencia para el estudio de los glioblastomas humanos así como posibles estrategias terapéuticas son los xenoinjertos. El presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar un modelo *in vivo*, simple, práctico, reproducible y de bajo costo implantando células de GBM humano U87-GFP en la corteza prefrontal de ratas inmunocompetentes de la cepa Wistar. Una ventaja considerable de nuestro modelo frente a otros modelos de xenoinjerto es el uso de la línea celular U87 que expresa de forma estable a la proteína verde fluorescente (GFP). Esta expresión constitutiva de la GFP nos permite rastrear y visualizar de manera directa la migración, invasión y el desarrollo tumoral de las células U87 en el tejido cerebral de la rata con certeza y exactitud, diferenciándolas de las células del huésped. También, las células U87 marcadas con la proteína GFP nos permite ahorrar tiempo y dinero ya que no es necesario su marcaje con otros anticuerpos. Para poder caracterizar dicho modelo se cuantificaron procesos clave en la gliomagénesis como la migración celular y el tamaño tumoral.

El GBM se caracteriza por tener un patrón altamente invasivo e infiltrativo en el parénquima cerebral (Agnihotri et al. 2013). Para el desarrollo del modelo, se determinó la migración celular (μm) a los tiempos de 2, 4 y 8 semanas a partir del xenoinjerto. Todas las ratas implantadas formaron un tumor desde las 2 semanas y no hubo evidencia de rechazo tumoral a ese tiempo. En la Figura 8A se puede observar la migración de las células tumorales desde la zona de implantación hasta la formación de una masa tumoral. En todos los tiempos de desarrollo se observó que las células tumorales migraban hacia la zona del cuerpo calloso y la zona del estriado. El cuerpo calloso es un conjunto de fibras nerviosas que conecta los dos hemisferios cerebrales. Esta estructura está formada por axones mielinizados y no mielinizados así como células gliales y neuronas (Barbaresi, et. al. 2014). No hubo un cambio estadísticamente significativo en la migración celular en ninguno de los grupos como se muestra en la Figura 8B. Esto nos podría indicar que las células de GBM encuentran en la zona del cuerpo calloso y la zona del cuerpo estriado un nicho para crecer, siendo independiente la migración al tiempo de desarrollo del tumor.

Se ha reportado anteriormente que la dirección de la migración de células de astrocitomas humanos implantadas en el cerebro de la rata es ventralmente a través de la sustancia gris cortical y hacia el cuerpo calloso (Laws et al. 1993), lo cual es consistente con nuestros resultados. La capacidad que tienen las células U87-GFP para invadir el parénquima cerebral es biológicamente distinto de la de otros tejidos debido a que no solo depende de las características genéticas de dicha célula, sino de las interacciones de las células con factores microambientales del tejido cerebral como la composición de la matriz extracelular (MEC), que difiere de la MEC de otros órganos y de enzimas que degradan la matriz extracelular, llamadas proteasas (Verbovšek et al. 2014).

La MEC cerebral consiste principalmente en glucosaminoglicanos (GAG) y proteoglicanos (Rauch 2007). Según la investigación realizada por Guillamo y colaboradores en el 2001, la materia blanca tiene una composición en su matriz extracelular rica en ácido hialurónico (HA), proteoglicanos de sulfato de condroitina

y brevicano, entre otros. Todos estos compuestos pueden influir en la motilidad de las células tumorales al proporcionarles un sustrato fácil de degradar en comparación con otros compartimentos parenquimatosos (Guillermo et al. 2001). Un estudio realizado por Leroi De Souza en el 2013 con la línea celular U87, determinó que el ácido hialurónico (HA), es un GAG importante en la composición de la matriz extracelular que está involucrado en la migración, el desarrollo, la proliferación, la invasión y la resistencia terapéutica en el glioblastoma (DeSouza et al. 2013). En GBM, el proceso de invasión y migración involucra una mayor síntesis y secreción de proteasas como cisteína, serina y metaloproteasas de matriz como MMP2 y MMP9 (colagenasas tipo IV) que van a degradar selectivamente los componentes de la MEC (Rao 2003).

Para cuantificar el desarrollo tumoral, se midió el área de daño (μm^2) provocado por las células tumorales así como la intensidad de fluorescencia de las mismas, una medida indirecta de la densidad celular. En la Figura 9A se puede apreciar una tendencia a la disminución del tumor conforme avanza el tiempo de desarrollo. Cuantificando el área tumoral como se muestra en la Figura 9B, podemos decir que existe un cambio estadísticamente significativo en el área del tumor entre las 2 y 8 semanas de desarrollo. Por otro lado, al medir la intensidad de fluorescencia (Figura 10) se determinó que existe un decremento en la densidad de células U87-GFP a las 8 semanas con respecto a las 2 semanas. Esto nos indica que hubo una disminución de la masa celular mediada probablemente por el sistema inmune del animal. Con estos resultados, sería necesario estudiar los procesos de invasividad, migración celular y proliferación a un tiempo menor de 2 semanas después del xenotrasplante para poder predecir con mayor exactitud el comportamiento que tienen las células U87-GFP en el desarrollo del tumor a los 5, 7 y 12 días. También, obtenidos éstos resultados, es posible pensar que a un tiempo mayor de 8 semanas existirá una disminución mayor tanto en el tamaño del tumor como en la densidad celular.

El sistema inmune puede identificar y eliminar células tumorales en un proceso llamado vigilancia inmune, en donde células del sistema inmune innato y

adaptativo, moléculas efectoras, y vías de señalización actúan conjuntamente como mecanismos supresores de tumores (Vesely et al. 2011). En nuestro modelo, la incompatibilidad del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) juega un papel muy importante en el rechazo de la formación de una masa tumoral en las ratas inmunocompetentes inoculadas con células de GBM humano. En el trabajo realizado por Huszthy, en donde trabajaron con animales inmunocompetentes trasplantados con esferoides de biopsia de GBM humano, determinaron que existe un rechazo mediado por la respuesta del sistema inmune del roedor por la infiltración masiva de leucocitos, macrófagos, monocitos ED1+, linfocitos T cooperadores (CD4+), linfocitos T citotóxicos (CD8+), citocinas proinflamatorias (IL-1 α , IL-2, IL-8, IL-1) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), principalmente (Huszthy et al. 2015). Estas citocinas son generalmente producidas por macrófagos activados, microglia tipo M1 y por astrocitos reactivos, aumentando la respuesta de las células T citotóxicas (González et al. 2014). También se sabe que éstas citocinas proinflamatorias inducen la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1 y VCAM-1) en el endotelio cerebral para promover la entrada de linfocitos activados al SNC (Merrill and Murphy 1997). Con base en lo anterior, podemos explicar la disminución en el tamaño del tumor y la densidad celular observada a las 8 semanas en nuestro modelo.

En trabajos realizados anteriormente por Camacho Arroyo y colaboradores, demuestran que la progesterona (P4), una hormona esteroide relacionada con la progresión del cáncer, induce la proliferación y por lo tanto, aumenta el área del tumor en xenotransplantes de células de astrocitomas humanos (U251) en la corteza motora de rata. Sus resultados nos demuestran que el tratamiento con un promotor de la proliferación, como lo es la P4, puede aumentar el tamaño del tumor, la infiltración y la proliferación de las células de astrocitomas a través de la interacción con su receptor intracelular (PR), un factor de transcripción activado por ligando que regula la expresión de varios genes implicados en el desarrollo, el metabolismo y la reproducción (Germán-Castelán et al. 2014). En otro de sus trabajos, usando un xenotrasplante de células de GBM humano U87 en la corteza cerebral de la rata, igual que nuestro modelo animal, resultados similares

corroboraron que la P4 aumenta el crecimiento y la infiltración tumoral mediada por la interacción con el PR intracelular (Germán-Castelán et al. 2016). Con estos resultados, podemos sugerir que la intervención de un factor externo que induce la proliferación como la administración de la progesterona en dichas ratas puede afectar distintos procesos involucrados en la gliomagénesis. En nuestro modelo, únicamente se implantaron dichas células sin ningún tratamiento post-implantación como en los trabajos antes comentados.

Uno de los genes blanco conocido del PR es el factor de bloqueo inducido por progesterona (PIBF) (Druckmann and Druckmann 2005). Se sabe que el PIBF tiene un papel muy importante al reducir la tasa Th1/Th2 ocasionando la disminución de la actividad citotóxica de los linfocitos maternos, con el propósito de que el feto evada el sistema inmunológico de la madre. Se ha propuesto que las células cancerosas escapan del sistema inmune usando mecanismos muy similares a los utilizados por el embrión en el desarrollo del embarazo (Kyurkchiev et al. 2014). Estudios *in vitro* han demostrado que la P4 mediante la acción de PIBF favorece el crecimiento tumoral, la neoangiogénesis y la invasividad de tejido (Gutierrez-Rodriguez et al. 2009). Se ha propuesto que el PIBF es un agente inmunomodulador que mediante la supresión de la actividad de células NK y el cambio de la respuesta inmune al tipo Th2 puede proporcionar a las células de GBM un mecanismo de evasión del sistema inmune del organismo y favorecer la progresión tumoral (Kyurkchiev et al. 2014). El incremento de citocinas Th2 debido a PIBF también provoca la producción de anticuerpos asimétricamente glicosilados por los linfocitos B, los cuales facilitan el crecimiento tumoral debido a que dichos anticuerpos no pueden realizar sus funciones efectoras (fijación del complemento y citotoxicidad), sino que funcionan como anticuerpos de bloqueo (Kelemen et al. 1996). Los resultados obtenidos por Gutierrez-Rodriguez y colaboradores demuestran que la presencia de la proteína inmunomoduladora PIBF en líneas celulares de GBM promueve la proliferación, la migración y la invasión de células U87 y U251 (Gutierrez-Rodriguez et al. 2009).

Según un estudio realizado por Cunha, dónde usaron animales inmunosuprimidos con ciclosporina y controles inmunocompetentes implantados subcutáneamente con células de GBM, observaron que las ratas control muestran un comportamiento similar a nuestros animales. Ellos observan un aumento progresivo en el volumen del tumor a las 3 semanas y posteriormente se observa un decremento del volumen tumoral a las 4 semanas en los animales inmunocompetentes, mientras que los animales inmunosuprimidos se ve un aumento exponencial a las mismas semanas (Cunha et al. 2011).

Con esta información, se puede sugerir que la disminución del tumor a las 8 semanas en nuestro modelo se deba a dos formas principalmente; de manera indirecta, por medio de células presentadoras de antígenos (APC) que activan a las células T CD4+ y a su vez expresan citocinas proinflamatorias que promueven la muerte celular mediante macrófagos o la microglia. La segunda forma, sería el reconocimiento directo de antígenos ajenos al sistema inmune de la rata que se presentan en el receptor de MHC de tipo I el cual va a desencadenar una respuesta por parte de células citotóxica efectoras CD8+. La respuesta inmune innata y adaptativa de la rata jugará un papel importante en la supresión del tumor después de cierto tiempo de haberse llevado a cabo el xenoinjerto sin haber administrado un promotor de la proliferación celular como puede ser la P4.

Finalmente, los resultados obtenidos nos dan un panorama general del trabajo experimental que se puede llevar a cabo con este modelo. Al observarse una disminución significativa en el tamaño tumoral conforme transcurre un mayor tiempo, sería recomendable trabajar con este modelo animal a las 2 semanas de desarrollo sin dejar pasar más tiempo al creer que a un mayor tiempo de desarrollo, conllevará un mayor tamaño de masa tumoral. Sería preferible no exceder el tiempo de desarrollo de 8 semanas al trabajar con los animales inmunocompetentes debido a que una disminución en el desarrollo tumoral se puede atribuir incorrectamente a algún tratamiento experimental y no a la respuesta inmune propia del animal. Con esto, se podría sugerir trabajar con animales inmunosuprimidos por ejemplo con ciclosporina, un agente inmunosupresor, para implantar la línea celular U87-GFP y

no tener presente la respuesta inmune del huésped en el rechazo tumoral. Finalmente, además del estudio de los procesos de migración y desarrollo tumoral, se podría trabajar con un marcador de la proliferación celular (ki-67) para complementar nuestro modelo animal de GBM.

10. CONCLUSIONES

Las células U87-GFP derivadas de un glioblastoma humano desarrollan un tumor en la corteza prefrontal de la rata a partir de las 2 semanas y hasta las 4 semanas después del xenoinjerto.

El proceso de migración celular de las células U87-GFP no muestra un cambio estadísticamente significativo a un mayor tiempo de desarrollo de 4 y 8 semanas. Sin embargo, el área del tumor y la densidad celular disminuyen notablemente a un tiempo de 8 semanas.

11. PERSPECTIVAS

Cuantificar procesos de invasividad, migración y proliferación en un xenoinjerto de las células U87-GFP a tiempos menores de desarrollo (3, 5, 10 y 12 días).

12. ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
APC	Célula presentadora de antígeno
ASLV	Virus de leucosis de sarcoma aviar
BLI	Imagen de bioluminiscencia
GAG	Glucosaminoglicanos
CD4+	Cluster of Differentiation 4
CD44	Cluster of Differentiation 44
CD8+	Cluster of Differentiation 8
CD	Células Dendríticas
CO₂	Dióxido de carbono
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
GBM	Glioblastoma multiforme
GEMM	Modelo de ratón genéticamente modificado
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GFP	Proteína verde fluorescente
HA	Ácido hialurónico
IDH-1	Isocitrato deshidrogenasa 1
IL-18	Interleucina 18
IL-1α	Interleucina 1-alfa
IL-8	Interleucina 8
INNN	Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
MEC	Matriz Extracelular

MET	Receptor del factor de crecimiento del hepatocito
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MRI	Imagen de resonancia magnética
NF-1	Neurofibromatosis tipo 1
NF$\kappa$$\beta$	Factor nuclear kappa Beta
NK	Natural Killer
OLIG2	Factor Transcripcional de Oligodendrocitos 2
OMS	Organización Mundial de la Salud
PDGFRA	Receptor A del Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDX	Xenoinjerto derivado de pacientes
PIBF	Factor de bloqueo inducido por progesterona
PTEN	Fosfatasa tensina homóloga
P4	Progesterona
Rb	Gen de Retinoblastoma
RNA_m	Ácido ribonucleico mensajero
PR	Receptor a progesterona
SFB	Suero fetal bovino
SNC	Sistema nervioso central
TMZ	Temozolamida
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa

13. REFERENCIAS

- Agnihotri, Sameer et al. 2013. "Glioblastoma, a Brief Review of History, Molecular Genetics, Animal Models and Novel Therapeutic Strategies." *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 61(1): 25–41.
- Arko, Leopold et al. 2010. "Experimental Approaches for the Treatment of Malignant Gliomas." *Pharmacology and Therapeutics* 128(1): 1–36.
- Barbaresi, Paolo, Mara Fabri, and Emanuela Mensà. 2014. "Characterization of NO-Producing Neurons in the Rat Corpus Callosum." *Brain and Behavior* 4(3): 317–36.
- Biasibetti, Elena et al. 2017. "Comparison of Allogeneic and Syngeneic Rat Glioma Models by Using MRI and Histopathologic Evaluation." *Comparative Medicine* 67(2): 147–56.
- Burnet, Neil G. et al. 2007. "High Grade Glioma: Imaging Combined with Pathological Grade Defines Management and Predicts Prognosis." *Radiotherapy and Oncology* 85(3): 371–78.
- Chalfie, M et al. 1994. "Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression." *Science* 263(1988): 802.
- Chen, Fuyi, Albert J. Becker, and Joseph J. LoTurco. 2014. "Contribution of Tumor Heterogeneity in a New Animal Model of CNS Tumors." *Molecular Cancer Research* 12(5): 742–53.
- Chen, Fuyi, Albert Becker, Joseph Loturco. 2017. "Overview of transgenic glioblastoma and oligoastrocytoma CNS models and their utility in drug discovery." *Current protocols in pharmacology*. 72: 14.37.1–14.372.
- Chen, Leon et al. 2013. "Vertebrate Animal Models of Glioma: Understanding the Mechanisms and Developing New Therapies." *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* 1836(1): 158–65.
- Ciezka, Magdalena et al. 2016. "Development of a Transplantable Glioma Tumour Model from Genetically Engineered Mice: MRI/MRS/MRSI Characterisation." *Journal of Neuro-Oncology* 129(1): 67–76.
- Clark, Aaron J., Shayan Fakurnejad, Quanhong Ma, and Rintaro Hashizume. 2016. "Bioluminescence Imaging of an Immunocompetent Animal Model for Glioblastoma." *Journal of Visualized Experiments* (107): 1–7.
- Cunha, Alexandre M et al. 2011. "A Murine Model of Xenotransplantation of Human Glioblastoma with Immunosuppression by Orogastic Cyclosporin." *Arquivos de neuro-psiquiatria* 69(1): 112–17.
- Daniel, Vincent C. et al. 2009. "A Primary Xenograft Model of Small-Cell Lung

- Cancer Reveals Irreversible Changes in Gene Expression Imposed by Culture in Vitro." *Cancer Research* 69(8): 3364–73.
- DeSouza, Leroi V. et al. 2013. "Role of Moesin in Hyaluronan Induced Cell Migration in Glioblastoma Multiforme." *Molecular Cancer* 12(1): 1. Molecular Cancer.
- De Vleeschouwer, Steven. 2017. *Glioblastoma*. Department of Neurosurgery, University Hospitals Leuven, Leuven, Belgium. Codon Publications.
- Druckmann, René, and Marc Alexandre Druckmann. 2005. "Progesterone and the Immunology of Pregnancy." *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 97(5): 389–96.
- Fillmore, H L et al. 1999. "An in Vivo Rat Model for Visualizing Glioma Tumor Cell Invasion Using Stable Persistent Expression of the Green Fluorescent Protein." *Cancer Letters* 141: 9–19.
- Frese, Kristopher K., and David A. Tuveson. 2007. "Maximizing Mouse Cancer Models." *Nature Reviews Cancer* 7(9): 645–58.
- Garcia, Celina et al. 2014. "The Orthotopic Xenotransplant of Human Glioblastoma Successfully Recapitulates Glioblastoma-Microenvironment Interactions in a Non-Immunosuppressed Mouse Model." *BMC Cancer* 14(1): 1–11.
- Gengenbacher, Nicolas, Mahak Singhal, and Hellmut G. Augustin. 2017. "Preclinical Mouse Solid Tumour Models: Status Quo, Challenges and Perspectives." *Nature Reviews Cancer* 17(12): 751–65.
- Germán-Castelán, Liliana et al. 2014. "Progesterone Induces the Growth and Infiltration of Human Astrocytoma Cells Implanted in the Cerebral Cortex of the Rat." *BioMed Research International* 2014.
- Germán-Castelán, Liliana, Joaquín Manjarrez-Marmolejo, Aliesha González-Arenas, and Ignacio Camacho-Arroyo. 2016. "Intracellular Progesterone Receptor Mediates the Increase in Glioblastoma Growth Induced by Progesterone in the Rat Brain." *Archives of Medical Research* 47(6): 419–26.
- Girotti, Maria Romina et al. 2016. "Application of Sequencing, Liquid Biopsies, and Patient-Derived Xenografts for Personalized Medicine in Melanoma." *Cancer Discovery* 6(3): 286–99.
- Goldbrunner, Roland H. et al. 2000. "Vascular Endothelial Growth Factor-Driven Glioma Growth and Vascularization in an Orthotopic Rat Model Monitored by Magnetic Resonance Imaging." *Neurosurgery* 47(4): 921–30.
- González, Hugo, Daniela Elgueta, Andro Montoya, and Rodrigo Pacheco. 2014. "Neuroimmune Regulation of Microglial Activity Involved in Neuroinflammation and Neurodegenerative Diseases." *Journal of Neuroimmunology* 274(1–2): 1–

13.

Guillamo, J S et al. 2001. "Migration Pathways of Human Glioblastoma Cells Xenografted into the Immunosuppressed Rat Brain." *J Neurooncol* 52(3): 205–15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11519850>.

Gutierrez-Rodriguez, Aracelli; Hansberg-Pastor, Valeria; Camacho-Arroyo, Ignacio. 2009. "Proliferative and Invasive Effects of Progesterone-Induced Blocking Factor in Human Glioblastoma Cells." *BioMed Research International* 33(6): 1208–19.

Hicks, J., S. Platt, M. Kent, and A. Haley. 2017. "Canine Brain Tumours: A Model for the Human Disease?" *Veterinary and Comparative Oncology* 15(1): 252–72.

Holland, Eric C., Wendy P. Hively, Ronald A. DePinho, and Harold E. Varmus. 1998. "A Constitutively Active Epidermal Growth Factor Receptor Cooperates with Disruption of G1cell-Cycle Arrest Pathways to Induce Glioma-like Lesions in Mice." *Genes and Development* 12(23): 3675–85.

Huszthy, Peter C et al. 2012. "Pitfalls and Perspectives." *Neuro-oncology* 14(8): 979–93.

Huszthy, Peter C. et al. 2015. "Engraftment of Human Glioblastoma Cells in Immunocompetent Rats through Acquired Immunosuppression." *PLoS ONE* 10(8): 1–17.

Idilli, Aurora Irene, Francesca Precazzini, Maria Caterina Mione, and Viviana Anelli. 2017. "Zebrafish in Translational Cancer Research: Insight into Leukemia, Melanoma, Glioma and Endocrine Tumor Biology." *Genes* 8(9).

Inoue, Yusuke et al. 2007. "Monitoring of Disease Progression by Bioluminescence Imaging and Magnetic Resonance Imaging in an Animal Model of Hematologic Malignancy." *Experimental Hematology* 35(3): 407–15.

Jung, S et al. 2001. "Tracking the Invasiveness of Human Astrocytoma Cells by Using Green Fluorescent Protein in an Organotypical Brain Slice Model." *Journal of neurosurgery* 94: 80–89.

Kelemen, K., I. Bogнар, M. Paal, and J. Szekeres-Bartho. 1996. "A Progesterone-Induced Protein Increases the Synthesis of Asymmetric Antibodies." *Cellular Immunology* 167(1): 129–34.

Kersten, Kelly, Karin E de Visser, Martine H van Miltenburg, and Jos Jonkers. 2017. "Genetically Engineered Mouse Models in Oncology Research and Cancer Medicine." *EMBO Molecular Medicine* 9(2): 137–53.

Kovacs, Zsofia et al. 2014. "Prolonged Survival upon Ultrasound-Enhanced Doxorubicin Delivery in Two Syngenic Glioblastoma Mouse Models." *Journal of Controlled Release* 187: 74–82.

- Ksendzovsky, Alexander et al. 2009. "Investigation of Immunosuppressive Mechanisms in a Mouse Glioma Model." *Journal of Neuro-Oncology* 93(1): 107–14.
- Kyurkchiev, Dobroslav et al. 2014. "Cells Isolated from Human Glioblastoma Multiforme Express Progesterone-Induced Blocking Factor (PIBF)." *Cellular and Molecular Neurobiology* 34(4): 479–89.
- Laws, E R, W J Goldberg, and J J Bernstein. 1993. "Migration of Human Malignant Astrocytoma Cells in the Mammalian Brain: Scherer Revisited." *International Journal of Developmental Neuroscience*. 11(5): 691–97.
- Lopez-Gonzalez, Miguel Angel, and Julio Sotelo. 2000. "Brain Tumors in Mexico: Characteristics and Prognosis of Glioblastoma." *Surgical Neurology* 53(2): 157–62.
- Louis, David N. et al. 2016. "The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Summary." *Acta Neuropathologica* 131(6): 803–20.
- Marrero, Luis et al. 2014. "Therapeutic Efficacy of Aldoxorubicin in an Intracranial Xenograft Mouse Model of Human Glioblastoma." *Neoplasia* 16(10): 874–82.
- Merrill, Jean E., and Seán P. Murphy. 1997. "Inflammatory Events at the Blood Brain Barrier: Regulation of Adhesion Molecules, Cytokines, and Chemokines by Reactive Nitrogen and Oxygen Species." *Brain, Behavior, and Immunity* 11(4): 245–63.
- Minniti, Giuseppe et al. 2008. "Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma in Elderly Patients." *Journal of Neuro-Oncology* 88(1): 97–103.
- Mione, M. C., and N. S. Trede. 2010. "The Zebrafish as a Model for Cancer." *Disease Models & Mechanisms* 3(9–10): 517–23.
- Morelli, MP et al. 2014. "Prioritizing Phase I Treatment Options Through Preclinical Testing on Personalized Tumorgraft." *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30(4):e45-e48.
- Oh, Taemin et al. 2014. "Immunocompetent Murine Models for the Study of Glioblastoma Immunotherapy." *Journal of Translational Medicine* 12(1): 1–10.
- Ohgaki, Hiroko, and Paul Kleihues. 2005. "Epidemiology and Etiology of Gliomas." *Acta Neuropathologica* 109(1): 93–108.
- Olar, Adriana, and Kenneth D. Aldape. 2014. "Using the Molecular Classification of Glioblastoma to Inform Personalized Treatment." *Journal of Pathology* 232(2): 165–77.

- Omuro, Antonio. 2013. "Glioblastoma and Other Malignant Gliomas." *JAMA* 310(17): 1842.
- Osoba, D, M Brada, W K Yung, and M D Prados. 2000. "Health-Related Quality of Life in Patients with Anaplastic Astrocytoma during Treatment with Temozolomide." *European Journal of Cancer* 36(14): 1788–95.
- Ostrom, Quinn T. et al. 2015. "CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012." *Neuro-oncology* 17: iv1-iv62.
- Paolillo M, Boselli C, Schhinelli S. 2018. "Glioblastoma under Siege: An Overview of Current Therapeutic Strategies." *Brain Sciences* 8(1): 15.
- Parsons, D Williams et al. 2008. "An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme." *Science* 321(5897): 1807–12.
- Rao, Jasti S. 2003. "Molecular Mechanisms of Glioma Invasiveness: The Role of Proteases." *Nature Reviews Cancer* 3(7): 489–501.
- Rauch, U. 2007. "Brain Matrix: Structure, Turnover and Necessity." *Biochemical Society Transactions* 35(4): 656–60.
- Read, Renee D., Webster K. Cavenee, Frank B. Furnari, and John B. Thomas. 2009. "A Drosophila Model for EGFR-Ras and PI3K-Dependent Human Glioma." *PLoS Genetics* 5(2).
- Richmond, A., and Y. Su. 2008. "Mouse Xenograft Models vs GEM Models for Human Cancer Therapeutics." *Disease Models and Mechanisms* 1(2–3): 78–82.
- Spector, David L., and Robert D. Goldman. 2010. "Constructing and Expressing Fluorescent Protein Fusions." *Cold Spring Harbor Protocols* 5(11): 1205–8.
- Stylli, Stanley S. et al. 2015. "Mouse Models of Glioma." *Journal of Clinical Neuroscience* 22(4): 619–26.
- Szatmári, Tünde et al. 2006. "Detailed Characterization of the Mouse Glioma 261 Tumor Model for Experimental Glioblastoma Therapy." *Cancer Science* 97(6): 546–53.
- Thomas, Nick et al. 2005. "Characterization and Gene Expression Profiling of a Stable Cell Line Expressing a Cell Cycle GFP Sensor." *Cell cycle* 4(1): 191–95.
- Tihan, Tarik, and Michele M. Bloomer. 2010. "Astrocytic Neoplasms of the Central Nervous System and Orbit: A Morphologic Perspective." *Seminars in Diagnostic Pathology* 27(2): 114–21.

- Verbovšek, Urška et al. 2014. "Expression Analysis of All Protease Genes Reveals Cathepsin K to Be Overexpressed in Glioblastoma." *PLoS ONE* 9(10).
- Verhaak, Roel G.W. et al. 2010. "Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1." *Cancer Cell* 17(1): 98–110.
- Vesely, Matthew D., Michael H. Kershaw, Robert D. Schreiber, and Mark J. Smyth. 2011. "Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer." *Annual Review of Immunology* 29(1): 235–71.
- Viotti, J. et al. 2014. "Glioma Tumor Grade Correlates with Parkin Depletion in Mutant p53-Linked Tumors and Results from Loss of Function of p53 Transcriptional Activity." *Oncogene* 33(14): 1764–75.
- Wegman-Ostrosky, Talia et al. 2016. "Clinical Prognostic Factors in Adults with Astrocytoma: Historic Cohort." *Clinical Neurology and Neurosurgery* 146: 116–22.
- Zuckermann, Marc et al. 2015. "Somatic CRISPR/Cas9-Mediated Tumour Suppressor Disruption Enables Versatile Brain Tumour Modelling." *Nature Communications* 6(May): 1–9.