

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

Opción Biología Celular y Molecular

# Optimización y caracterización de un modelo murino de tumorigénesis cerebral de uso potencial en la investigación diagnóstica y terapéutica

Lic. Ignacio Mastandrea

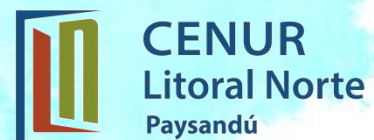
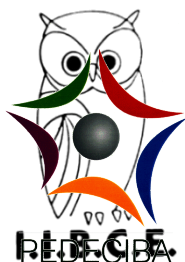
Directora de tesis: Dra. Silvia Olivera - Bravo

Co-director: Dr. Mauricio Cabrera

Tribunal: Dra. Mónica Brauer

Dr. Hugo Cerecetto

Dr. Rafael de Armas



Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.  
Laboratorio de I+D Moléculas Bioactivas, CenUR Litoral Norte – sede Paysandú, Universidad de la República, Uruguay

Montevideo, Abril de 2017



Resumen	6
<b>INTRODUCCIÓN</b>	7
<u>CÁNCER</u>	8
GENERALIDADES DEL CANCER	8
EPIDEMIOLOGIA	12
<u>GLIOMAS</u>	14
GENERALIDADES	14
EPIDEMIOLOGIA	16
DIAGNÓSTICO Y TERAPIA	18
<u>MODELOS ANIMALES DE CARCINOGENESIS</u>	20
GENERALIDADES	20
MODELOS ANIMALES DE GLIOMA	23
INDUCCIÓN QUÍMICA DE GLIOMAS	24
MODELOS DE TRASPLANTE DE CÉLULAS	28
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	34
HIPOTESIS	35
OBJETIVO GENERAL	35
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
<b>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b>	36
A- Modelo de carcinogénesis química inducida en neonatos	37
B- Modelo singénico de trasplante celular ectópico	38
C- Modelo singénico de trasplante celular ortotópico	39
Determinación de carácter infiltrante	41
Observación de atipias nucleares	41
Reconocimiento de perfiles vasculares	41
Expresión de marcadores de célula madre tumoral	42
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	43
MATERIALES	44
MÉTODOS	44
Cultivo y transformación de células gliales	44
Criopreservación	45
Descongelado y revitalización	45

Mantenimiento de las células	46
Recuento y evaluación de viabilidad celular	46
<b>ANIMALES</b>	46
<b>ABORDAJES TENDIENTES A LA PRODUCCIÓN DE TUMORES INTRACEREBRALES</b>	47
Modalidad A: Administración de MNU en la cisterna magna de neonatos	47
Modalidad B: Administración de células transformadas en la cisterna magna	48
Modalidad C: Administración intracerebral de células transformadas mediante estereotaxia	48
Procesamiento de los animales	51
Obtención de cortes sagitales y coronales de cerebro	52
Tinción de Nissl clásica con azul de metileno	52
Inmunohistoquímica	53
Reclutamiento antigénico para inmunohistoquímica	54
Histoquímica para lectina de tomate	55
Observación de las muestras mediante microscopía láser confocal y microscopía de luz	55
<b>PRUEBA PILOTO EMPLEANDO TOMOGRAFIA DE EMISIÓN DE POSITRONES</b>	56
Anestesia	56
Adquisición de imágenes	56
Análisis cualitativo de los resultados	56
<b>RESULTADOS</b>	58
<b>A- ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO ANIMAL DE GLIOMA POR CARCINOGENÉISIS QUÍMICA</b>	59
<b>B- DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE UN MODELO ANIMAL DE TRASPLANTE CÉLULAR ECTÓPICO</b>	62
<b>C- DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE UN MODELO ANIMAL DE TRASPLANTE CÉLULAR ORTOTOPICO</b>	64
La inyección estereotáxica de las células transformadas indujo la aparición de neoplasias cerebrales en animales inmunocompetentes	64
La inyección de células C6 también provocó la aparición de neoplasias cerebrales	65
<b>CHARACTERIZACIÓN PRIMARIA DE LOS TUMORES INDUCIDOS</b>	68
Los tumores inducidos por inyección de células transformadas son infiltrantes	68
Núcleos atípicos en tumores inducidos por inyección de células transformadas	70
Los tumores inducidos por ambos tipos celulares presentan alteraciones vasculares	71
Expresión de marcadores de célula madre tumoral y de precursores gliales en los tumores inducidos	73
Los tumores de CTs se pueden visualizar por PET a tiempo final	76

<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b>	79
A- FALLA EN LA INDUCCIÓN DE TUMORES CEREBRALES MEDIANTE CARCINOGENESIS QUÍMICA	80
B- INDUCCIÓN DE TUMORES ESPINALES MEDIANTE TRASPLANTE CELULAR ECTÓPICO	81
C- INDUCCIÓN DE TUMORES CEREBRALES MEDIANTE TRASPLANTE CELULAR ORTOTÓPICO	82
Carácter infiltrante de los tumores inducidos	82
Atipia nuclear	84
Alteraciones vasculares	84
Expresión de marcadores de células madre tumorales y progenitores	84
Análisis de PET	86
CONCLUSIONES	87
PERSPECTIVAS	88

## Resumen

---

Los gliomas son los tumores más agresivos del sistema nervioso central (SNC) con una alta incidencia de muerte dependiendo de las características y estadio al momento del diagnóstico. La ausencia de marcadores confiables de las etapas tempranas y terapias eficaces conspiran contra el pronóstico favorable para quienes sufren de esta enfermedad. El desarrollo de modelos animales que reproduzcan fielmente los tumores humanos es de vital importancia para la investigación en ambas problemáticas.

Actualmente, los modelos de trasplante de células de glioma en roedores inmunodeprimidos son los más ampliamente utilizados. Sin embargo, los hallazgos patológicos del tumor inducido son a menudo diferentes de los gliomas humanos. Más aún, la necesidad de inmunosupresión que usualmente requiere el trasplante impide reproducir las interacciones tumor-microambiente que ocurren en los pacientes.

En esta tesis se propone desarrollar un modelo de tumorigénesis cerebral utilizando el carcinógeno N-metil-N-nitrosourea (MNU) de forma directa, inyectándolo en animales o indirecta, utilizándolo para transformar un cultivo primario de astrocitos. En base a modificaciones novedosas de los modelos tradicionales y nuevas herramientas generadas, se proponen tres estrategias de trabajo: inducción química por inyección de MNU en neonatos y trasplante singénico de células transformadas en el laboratorio, ya sea en modalidad ectópica u ortotópica. De las tres modalidades implementadas, el modelo de trasplante celular ortotópico en animales inmunocompetentes demostró ser la más exitosa, logrando inducir neoplasmas únicos en el 90% de animales inyectados en ubicaciones y a tiempos reproducibles. La caracterización primaria de dichos tumores reveló que los neoplasmas desarrollados son infiltrantes y expresan marcadores de células madre de cáncer y precursores de progenitores gliales. La masa tumoral primaria presenta zonas proliferativas con presencia de células gigantes que muestran núcleos atípicos multi-lobulados y vasos sanguíneos de apariencia anormal. Ambas características, son similares a las encontradas en gliomas humanos y difícilmente reproducibles en los modelos usuales. Los tumores presentaron además, una buena captación de los radiofármacos más comúnmente utilizados en la clínica.

Dado que el modelo que hemos desarrollado supera varias de las principales desventajas presentadas por otros abordajes experimentales, creemos que el mismo puede constituir una nueva herramienta para el estudio de la biología básica de los gliomas, así como para la investigación diagnóstica y terapéutica.

---



# INTRODUCCIÓN

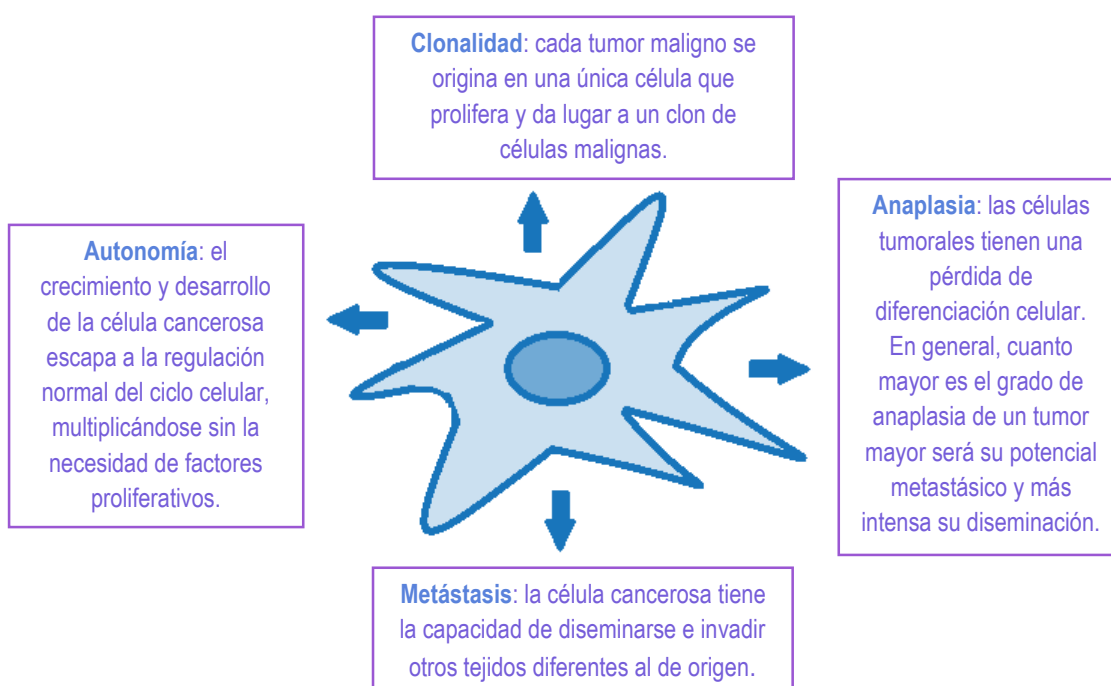


# CÁNCER

## GENERALIDADES DEL CÁNCER

En la actualidad la definición de cáncer abarca a un grupo heterogéneo de enfermedades neoplásicas de etiología multifactorial cuyo factor común es un desequilibrio en la relación proliferación/ muerte celular. La adquisición de múltiples mutaciones genéticas provoca que las células cancerosas evadan los mecanismos de control propios y comiencen a dividirse descontroladamente, adquiriendo la capacidad de invasión (local o a veces a distancia) y destrucción tisular, comprometiendo la salud del organismo<sup>1</sup>.

Las características principales de las células cancerosas se resumen en el siguiente esquema<sup>2</sup>:



La proliferación celular descontrolada de las células mutantes puede dar origen a una masa celular conocida como tumor o neoplasma<sup>1</sup>. Entre los factores alterados en la biología de la célula cancerosa que permiten la formación y mantenimiento de la masa tumoral se encuentran la adquisición de la habilidad de evadir la respuesta inmune, de inducir la angiogénesis, la resistencia a la apoptosis y a las señales que reprimen su crecimiento, el mantenimiento de un estado proliferativo constante independientemente muchas veces del ambiente en que se encuentra (independencia de factores de crecimiento, modificación

<sup>1</sup> Kastan M. *Biología molecular del cáncer: el ciclo celular, en Cáncer; principios y práctica de oncología*. Editor DeVita, V. 5º ed, Arán Ediciones S.A., 2000.

<sup>2</sup> Cajaraville G., Carrera MJ, Massó J, Tamés MJ. *Oncología. En Farmacia Hospitalaria*. Editorial Médica Internacional S.A., 3ª Edición. Madrid. 2002. pág. 1171-1175.



del ambiente circundante promoviendo inflamación asociada al tumor) y un balance energético favorable que ocurre a costa de desbalancear las vías metabólicas, favoreciendo por ejemplo, la ruta glucolítica en detrimento de otras vías<sup>3</sup>.

Una vez formado el agregado celular, si las células neoplásicas permanecen agrupadas en una masa única, el tumor es benigno. Esto significa que las células anormales aún no han adquirido la capacidad de realizar metástasis, es decir, no se han diseminado hacia otros tejidos, por lo que mediante extirpación quirúrgica del tumor puede lograrse la curación<sup>4</sup>. Una vez que las células neoplásicas adquieren la capacidad de invadir el tejido circundante, el tumor se considera maligno y propiamente canceroso, debido a la capacidad de formar tumores secundarios o metastatizar otros lugares del cuerpo<sup>5</sup>.

El proceso de carcinogénesis puede originarse a partir de cualquier tipo de célula al producirse la ruptura del equilibrio celular normal a favor de la acumulación de células de manera descontrolada. El mismo puede ser dividido en tres etapas principales (**figura 1**)<sup>6,7</sup>:

- **Iniciación:** es la etapa en la cual ocurre una alteración genética de la célula. De manera general la mayoría de las neoplasias se inician por mutaciones o expresión anormal de genes que cumplen funciones vitales que posibilitan que la célula adquiera paulatinamente las habilidades anteriormente mencionadas que la identifican como cancerosa. La iniciación del proceso de carcinogénesis es modulada por agentes tanto exógenos como endógenos.
- **Promoción:** consiste en la expansión selectiva de las células iniciadas. Se producen alteraciones en las vías de transducción de señales celulares, por lo que su mecanismo de acción reside en una alteración de la expresión génica mediada por receptores específicos. Es un proceso reversible tanto a nivel de la expresión génica como a nivel celular y no se producen alteraciones estructurales directas en el ADN.
- **Progresión:** en esta etapa la célula iniciada se convierte en una célula potencialmente maligna. Este proceso es irreversible y las células que lo iniciaron se distinguen a nivel molecular por su alteración en la estructura genómica que se refleja en la inestabilidad cariotípica (aparición de aberraciones cromosómicas, trastorno del aparato mitótico, de la función de los telómeros, hipometilación del ADN, recombinación, amplificación y transposición génica aberrantes).

---

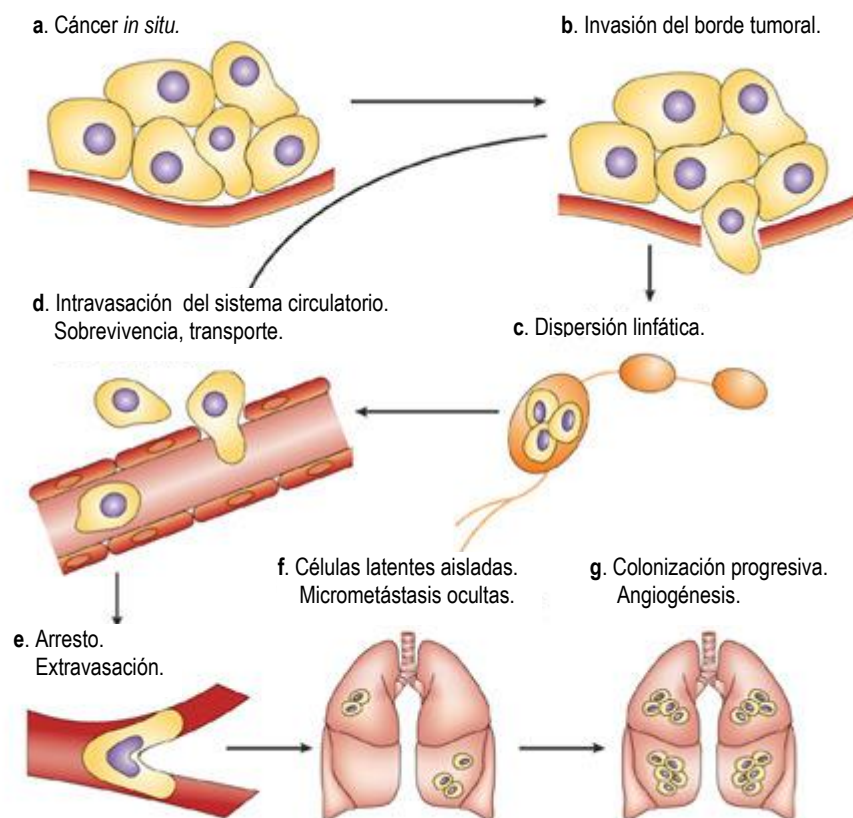
<sup>3</sup> Hanahan D, Weinberg RA. *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. Cell, 2011, 144(5): 646–674

<sup>4</sup> Rosenberg S. *Principios de tratamiento Del cáncer: cirugía oncológica, en Cáncer; principios y práctica de oncología*. Editor DeVita, V. 5ª ed, Arán Ediciones S.A., 2000.

<sup>5</sup> Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Biología molecular de la célula*. Ediciones Omega S.A., 5ª Edición. Barcelona. 2010.

<sup>6</sup> Dominguez, L. *Principios generales de carcinogénesis: carcinogénesis química y hormonal*. Biocancer, 2004, 1:1-9.

<sup>7</sup> Anisimov, VN. *Carcinogenesis and aging 20 years after: Escaping horizon*. Mechanisms of Ageing and Development, 2009, 130:105–121.



**Figura 1.** Esquema del proceso secuencial metastásico. Adaptada de Anisimov<sup>7</sup>

Posteriormente, con las divisiones celulares sucesivas de la población tumoral iniciada se van añadiendo nuevas mutaciones que alteran otras funciones celulares y otorgan la capacidad de invasión, angiogénesis y metastización, muchas de ellas necesarias para el mantenimiento del tumor. Por ejemplo, conforme la masa va creciendo, la neovascularización o angiogénesis se hace necesaria. La síntesis y secreción de diferentes moléculas angiogénicas y la supresión de moléculas inhibitoras son responsables de la formación de una red de capilares que nace del tejido hospedador circundante. Algunas células tumorales pueden inhibir la expresión de moléculas cohesivas y adquirir una mayor movilidad, separándose así de la lesión primaria y adquiriendo la capacidad de invasión. Los capilares y las vénulas de pared delgada constituyen las rutas más frecuentes para la entrada de las células tumorales al torrente circulatorio. La gran mayoría de las células tumorales que pasan al torrente sanguíneo son destruidas, pero aquellas que sobreviven son capaces de adherirse a las células endoteliales de los capilares o a las membranas basales subendoteliales expuestas, extravasándose y penetrando en el parénquima del órgano. Las células

tumorales que presentan los receptores celulares adecuados en su superficie pueden responder a factores de crecimiento parácrinos y de esa forma proliferar en el parénquima del órgano en que han penetrado<sup>8</sup>.

Uno de los criterios para la clasificación de los tumores deriva de las células o tejidos donde los mismos se originan. Aquellos tumores que derivan de células del tejido conectivo (hueso, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos y músculos) son conocidos como sarcomas, mientras que los carcinomas proceden de tejidos epiteliales, de epitelios que tapizan las cavidades y órganos corporales y de tejidos glandulares de mama y próstata. Un tercer tipo de tumor lo constituyen las leucemias y linfomas, que comprenden diversas formas de cáncer de los sistemas hematopoyético e inmunitario y un grupo adicional está formado por los tipos mixtos (carcinosarcoma y teratocarcinoma). Además de esa clasificación existen subdivisiones dentro de cada categoría según el tipo celular particular que dio origen, la localización del tumor en el cuerpo y su estructura. Cabe destacar que la mayor parte (aproximadamente el 90%) de los cánceres humanos son carcinomas, debido tanto al alto ritmo proliferativo de los tejidos epiteliales así como a la exposición de los mismos a diversas formas de lesiones físicas y químicas que pueden inducir el desarrollo del cáncer<sup>2,3</sup>.

Una característica de los tumores, importante para determinar el peligro que representa para el paciente y para contribuir a la realización del pronóstico de la enfermedad, es su grado histológico. El grado histológico corresponde a una escala cualitativa en donde se asigna un número para describir cuan anormal se ven bajo el microscopio las células y el tejido tumoral respecto a su tejido de origen. Esta escala asigna un grado en función del estado de diferenciación y la presencia de atipia celular y es útil como indicador de la rapidez en que un tumor puede llegar a crecer y diseminarse. A un tumor se le denomina “bien diferenciado” y se le asigna un grado bajo si sus células y la organización del tejido presenta características similares al tejido de origen de la neoplasia. Los tumores de grado bajo tienden a expandirse a una tasa mucho menor que un tumor “indiferenciado” o “pobremente diferenciado”, a los cuales se les asigna un grado alto. Los tumores de alto grado tienen células de apariencia anormal, pobremente diferenciadas (anaplásicas) y carecen de la estructura típica del tejido. Cabe destacar que la gradación del tumor no es lo mismo que la estadificación del mismo. El estadio del cáncer no hace referencia a características histológicas sino al tamaño y alcance del tumor primario<sup>9</sup>, luego de obtener los resultados radiológicos o paraclínicos generalmente.

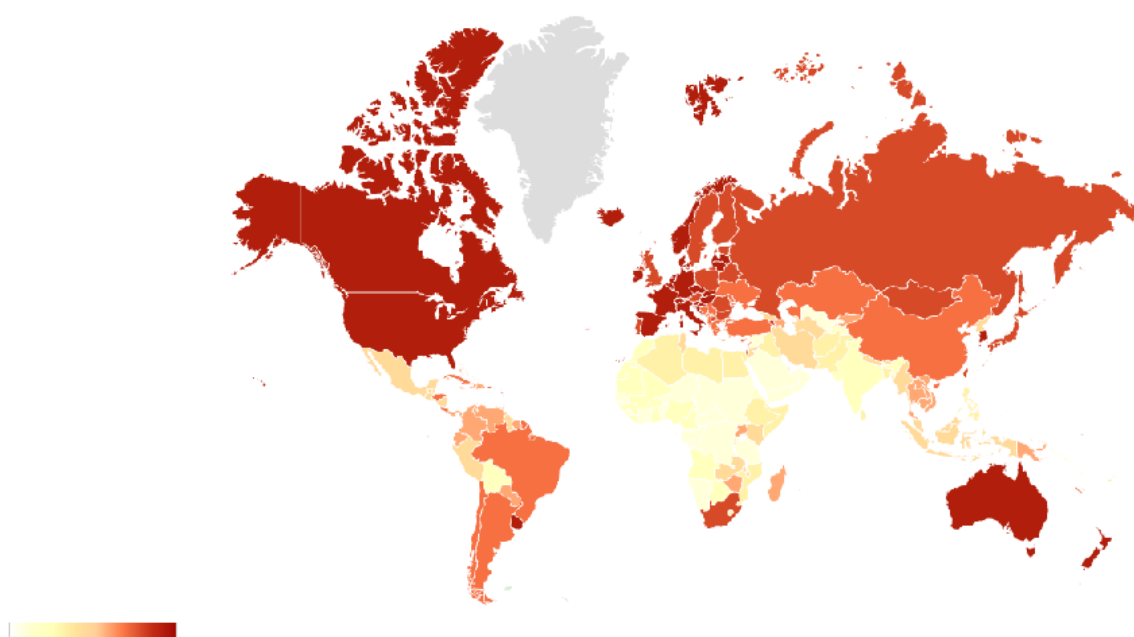
---

<sup>8</sup> DeVita, VT, Hellman S, Rosenberg SA. Cancer principles and practice of oncology. Lippincott Williams & Wilkins, 6ª Edición. Filadelfia. 2001. pág. 123-136.

<sup>9</sup> National Cancer Institute at the National Institutes of Health. Cancer topics: Detection and Diagnosis – Tumor Grades. <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/detection/tumor-grade>. Fecha de acceso: 11/2/2017

## EPIDEMIOLOGÍA

En Estados Unidos, en el año 2017, se estima que cerca de 1.7 millones de nuevos casos de cáncer serán reportados y que habrá más de 600 mil muertes atribuidas a esa enfermedad<sup>10</sup>. El cáncer es una causa común de morbilidad y mortalidad en los adultos mayores, ocurriendo el 50% de las neoplasias malignas en personas de más de 70 años<sup>11</sup>. Tal como se aprecia en la **figura 2**, tanto en hombres como mujeres, las regiones con mayor incidencia de cáncer son América del Norte, Australia, Nueva Zelanda y Europa del Norte y Oeste. Algunos tipos de cáncer comunes en los países desarrollados se asocian con mejor pronóstico y nivel de supervivencia (cáncer de próstata, de mama y colorrectal), mientras otros tienen pronósticos más comprometidos como el cáncer de hígado, estómago, esófago y de cerebro<sup>12</sup>.



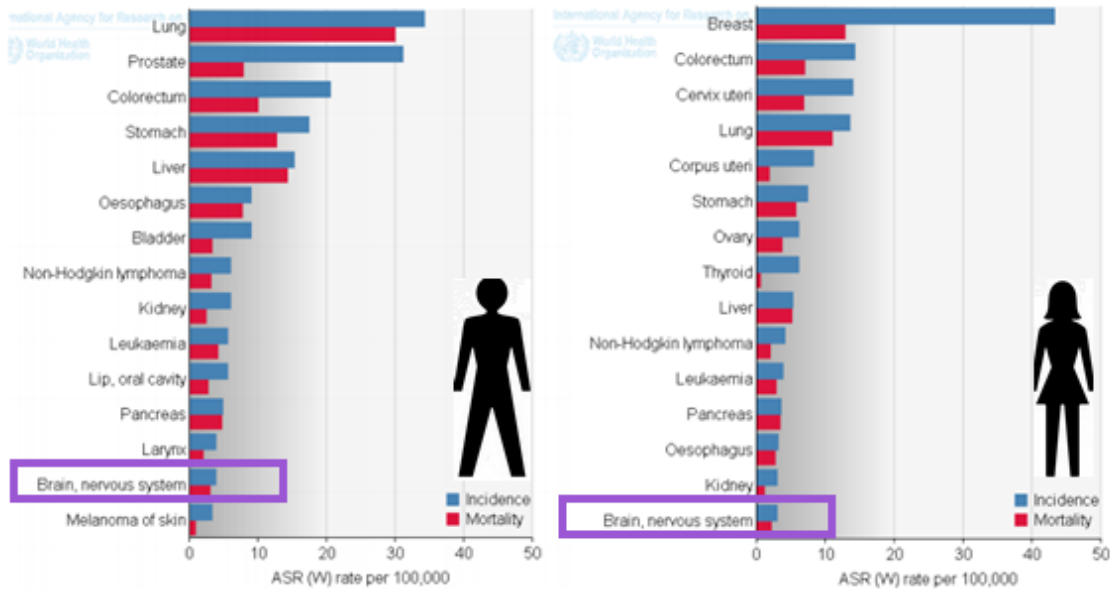
**Figura 2.** Incidencia del cáncer a nivel mundial. Se incluyen todos los tipos de cáncer (excepto cáncer de piel no melanoma). Las tasas están estandarizadas por edad, expresadas como número de casos cada 100.000 habitantes. Este esquema corresponde a la incidencia para la población masculina, las tasas y regiones de incidencia para la población femenina son muy similares. Adaptado de Globocan 2008<sup>12</sup>

<sup>10</sup> Cancer Facts & Figures 2017. American Cancer Society. <http://old.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-047079.pdf>. Fecha de acceso: 11/2/2017

<sup>11</sup> Anisimov, V. N. Carcinogenesis and aging 20 years after: Escaping horizon. 2009, *Mechanisms of Ageing and Development*, 130:105–121.

<sup>12</sup> GLOBOCAN 2008. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: **IARC** <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/all.asp>

Los resultados del relevamiento de la incidencia de diferentes tipos de cáncer discriminado por franjas etarias en todo el mundo, muestran que los principales tipos reportados son el cáncer de próstata, pulmón y colorrectal en hombres y el de mama, colorrectal y cuello uterino en mujeres (**figura 3**<sup>13</sup>).



**Figura 3.** Tasas normalizadas de incidencia y mortalidad de distintas variedades de cáncer<sup>13</sup>

Si bien los tumores del SNC no tienen una alta incidencia a nivel mundial, poseen un alto grado de morbilidad y mortalidad tal como se observa en el recuadro de la **figura 3**. El cáncer de cerebro abarca aproximadamente el 1,4% de todos los cánceres y el 2,3% de todas las muertes relacionadas con el cáncer<sup>14</sup>.

<sup>13</sup> World's Health Organization. *World Cancer Report 2012*, IARC Nonserial Publication, 2012.

<sup>14</sup> El-Zein R, Bondy M, Wrensch M. *Brain Tumors: Epidemiology of Brain Tumors. Contemporary Cancer Research*. 2005, pp 3-18.

## **GLIOMAS**

### **GENERALIDADES**

Aunque comúnmente los tumores son clasificados según el tipo celular que les da origen, existe un cierto desafío a la hora de aplicar este criterio en los tumores del SNC, ya que el origen de las células que conforman la neoplasia es desconocido para la mayoría de ellos. A modo de ejemplo, dentro de los tumores con mayor relevancia del SNC se encuentran los gliomas, denominados así por su presunto origen glial, aunque la evidencia experimental proveniente de modelos animales indica que es altamente probable que los gliomas se puedan originar incluso de neuronas<sup>15,16</sup>. Aun así, la clasificación histológica acordada por la OMS es usada universalmente en el campo de la neurooncología, ya que permite una separación significativa de tumores biológica y clínicamente distintos, cosa que ningún otro criterio de diagnóstico es capaz de hacer. La tendencia actual es emplear criterios moleculares además de la clasificación histológica proporcionando información más detallada del perfil genético del tumor, lo que influye en el pronóstico y puede determinar la respuesta a la terapia<sup>17</sup>.

Los astrocitomas, derivados de astrocitos o sus precursores, comprenden más de un 70% de las neoplasias gliales y abarcan a un grupo heterogéneo de tumores difusos e infiltrantes (astrocitoma difuso, astrocitoma anaplásico, glioblastoma y *gliomatosis cerebri*) y a un grupo menos común de neoplasmas con un crecimiento más limitado, como el astrocitoma pilocítico, el astrocitoma subependimal de células gigantes y el xantastrocitoma pleomórfico. Los astrocitomas del primer grupo son difíciles de remover por su naturaleza difusa e infiltrante, tienen gran tendencia a desarrollar malignidad por su inestabilidad genómica y se caracterizan por ser difíciles de tratar. Los astrocitomas del segundo grupo se desarrollan más frecuentemente en niños y adultos jóvenes, tienen un potencial limitado para la progresión maligna y son generalmente curados por resección quirúrgica.

Otro tipos de glioma de menor incidencia son los oligodendrogliomas (derivados de oligodendrocitos), los ependimomas (derivados de células ependimarias que forman el revestimiento de los ventrículos del encéfalo y del conducto ependimario) y los gliomas mixtos (formados por una población heterogénea de células neoplásicas de origen astrocitario y oligodendrogliar). Estos tipos de glioma pueden presentarse

---

<sup>15</sup> Shih AH, Holland EC. *Developmental neurobiology and the origin of brain tumors*. J Neurooncology. 2004, 70(2): 125–135

<sup>16</sup> Friedmann-Morvinski D, Bushong EA, Ke E, Soda Y, Marumoto T, Singer O, Ellisman MH, Verma IM. *Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice*. Science. 2012.

bien delimitados y exhibiendo características propias del tejido o pueden ser difusos, infiltrantes y de rasgos anaplásicos, lógicamente siendo mucho más agresivos<sup>17,18,19</sup>.

Además de la clasificación morfológica, la tipificación del tumor también involucra su gradación. La misma clasifica a los gliomas en grados desde el I (benignos) hasta el IV (alto grado de malignidad). Para la clasificación en grados se requiere un análisis anatomopatológico para determinar el grado de anormalidad del tejido extraído en la biopsia, asignándole un grado mayor a aquellas muestras que exhiben rasgos anaplásicos, gran celularidad, alta tasa mitótica, atipia nuclear, proliferación vascular y necrosis. Los gliomas grado I como el astrocitoma pilocítico tienen una proliferación limitada y pueden tener cura mediante la extirpación quirúrgica. Los gliomas grado II, aun considerados de bajo grado, se caracterizan por mostrar atipia citológica y por la capacidad de invadir el tejido circundante como en el caso de los astrocitomas difusos. Los gliomas considerados de alto grado, a partir del grado III, son los más temidos por su agresividad, mal pronóstico y su repercusión en las funciones cognitivas<sup>20</sup>. Se caracterizan por una alta tasa mitótica y por la presencia de anaplasia. Cuando se observa proliferación microvascular y/o necrosis, los gliomas se categorizan dentro de grado IV, también conocidos como glioblastomas multiformes (GBM)<sup>17</sup>. El 90-95% de los GBM se originan como GBMs primarios mientras que entre un 5-10% evolucionan a partir de gliomas de bajo grado, principalmente en pacientes jóvenes y se conocen como GBMs secundarios<sup>21</sup>. Los glioblastomas multiformes tienen muy mal pronóstico ya que son tumores extremadamente invasivos que infiltran fácilmente el parénquima cerebral, aunque típicamente no producen metástasis<sup>22</sup>. Gliomas de distinto grado se visualizan en la **figura 4**.

---

<sup>17</sup> Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. *The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary*. Acta Neuropathol. 2016 Jun;131(6):803-20.

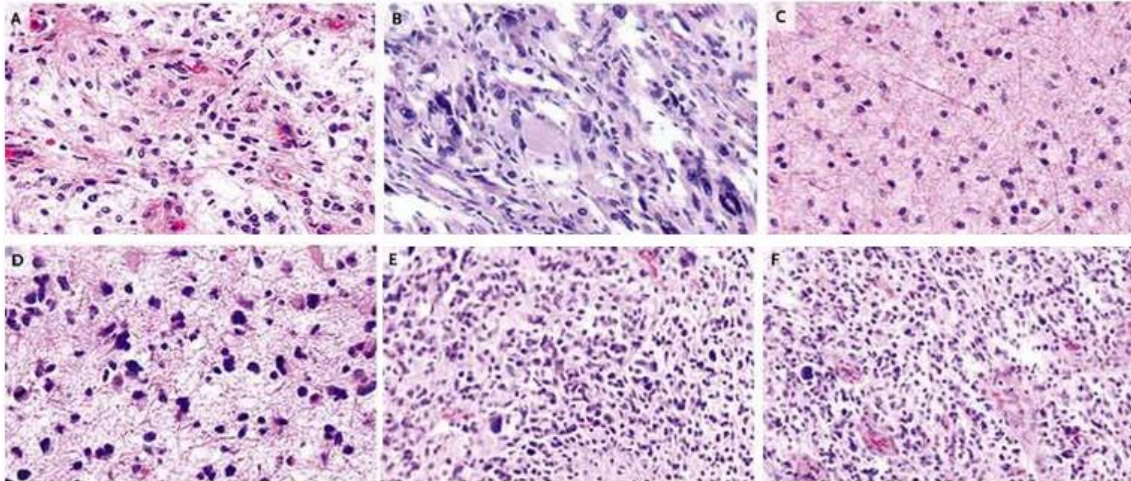
<sup>18</sup> Reifenberger G, Blümcke I, Pietsch T, Paulus W. *Oncology of CNS Tumors: Pathology and Classification of Tumors of the Nervous System*, 2ª Ed.; European Journal of Neurology. 2010.

<sup>19</sup> Hellman S. *Principios para el manejo del cáncer: radioterapia*, en *Cáncer: principios y práctica de oncología*. Editor DeVita V, 5ª ed, Arán Ediciones S.A., 2000.

<sup>20</sup> Porter KR, McCarthy BJ, Freels S, Kim Y, Davis FG. *Prevalence estimates for primary brain tumors in the United States by age, gender, behavior, and histology*. NeuroOncol, 2010, 12(6):520-527.

<sup>21</sup> Ohgaki H, Kleihues P. *Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas*. J Neuropathol Exp Neurol., 2005, 64(6):479-89.

<sup>22</sup> Gibbons RJ, Smith S, Antman E, *American College of Cardiology, American Heart Association. American College of Cardiology/American Heart Association clinical practice guidelines: PartI: where do they come from?* Circulation, 2003, 107(23):2979-2986.



**Figura 4.** Distintos tipos de glioma de alto y bajo grado visualizados con tinción clásica de hematoxilina-eosina. A corresponde a un astrocitoma pilocítico (grado I), B y C (xantoastrocitoma pleomórfico y astrocitoma difuso) y muestran gliomas de bajo grado con limitada capacidad de invadir tejido cerebral. En D se muestra un astrocitoma anaplásico de grado III. Finalmente en E y F se visualiza tejido correspondiente a un glioblastoma (astrocitoma grado IV). Adaptada de El-Zein et al. <sup>14</sup>

## EPIDEMIOLOGÍA

Como se observa en la **figura 5**, el tipo de tumor cerebral más frecuentemente reportado es el meningioma, que es un tumor benigno, seguido por el glioblastoma. Si agrupamos a todos los gliomas (mayoritariamente tumores malignos, corresponden a un 80% de los tumores malignos del SNC) en una categoría, estos abarcan aproximadamente un 30% de este tipo de tumores<sup>23</sup>.

<sup>23</sup> Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. *CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009*. Neuro-oncol. 2012;14(suppl 5):v1-v49.



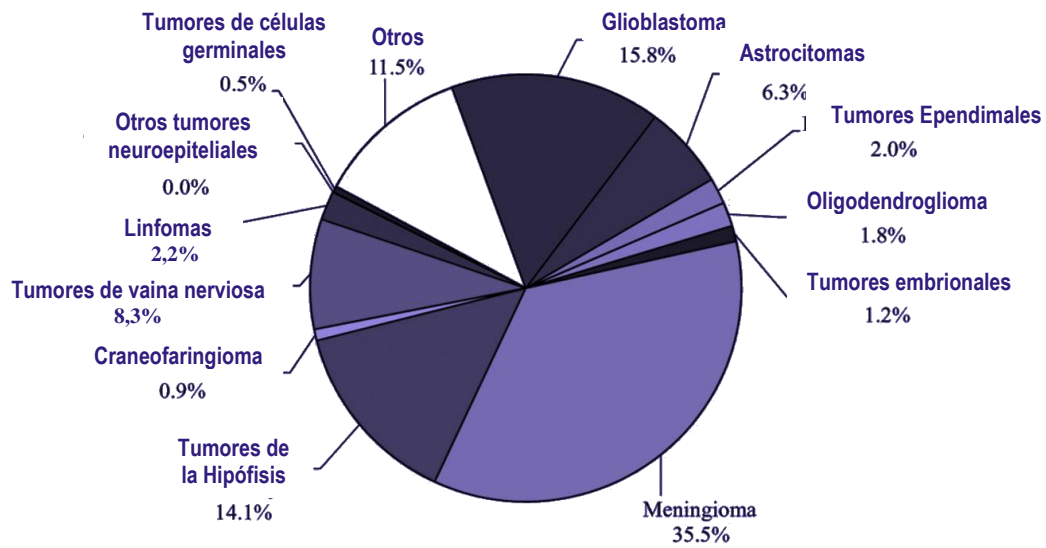


Figura 5. Distribución de los tumores del SNC según su origen, adaptado de Porter et al.<sup>24</sup>

Dentro de los gliomas, el GBM es el más frecuente y junto con las demás variedades de astrocitomas de menor grado comprenden más de tres cuartos de las variedades de gliomas reportadas (figura 6)<sup>24</sup>.

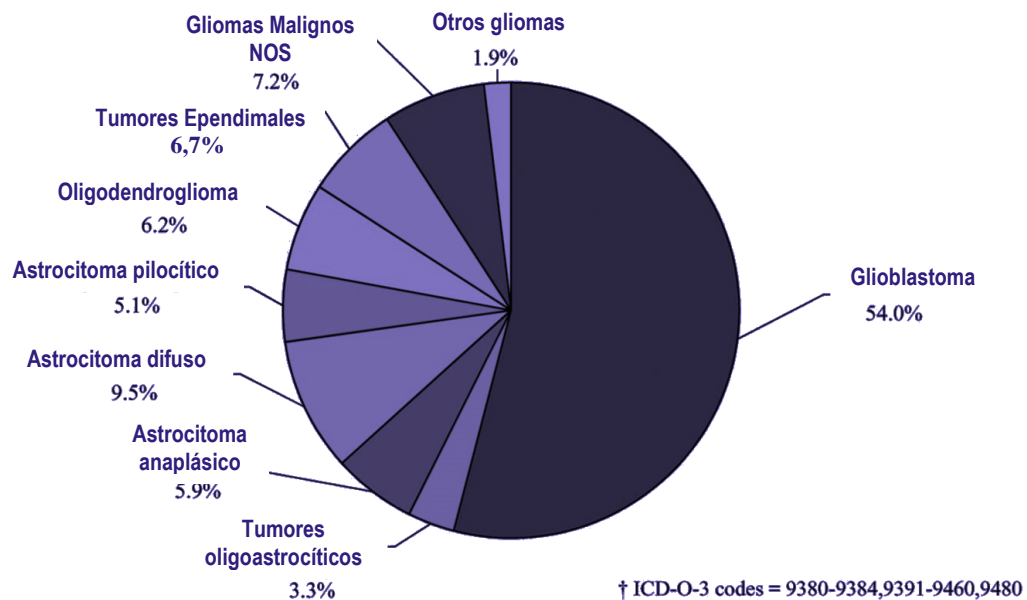


Figura 6. Distribución de los gliomas según su histología específica, adaptado de Porter et al.<sup>23</sup>

<sup>24</sup> Porter KR, McCarthy BJ, Freels S, Kim Y, Davis FG. Prevalence estimates for primary brain tumors in the United States by age, gender, behavior, and histology. NeuroOncol, 2010, 12(6):520527.

La supervivencia de los pacientes diagnosticados con glioma varía considerablemente de acuerdo a su edad, estilo de vida y tipo de tumor, así como su localización que es determinante tanto para su posible remoción quirúrgica como para las posibles secuelas de la cirugía. En la **tabla 1** se muestra la tasa de supervivencia a 5 años para varios grupos etarios y para distintos gliomas, cabe destacar que algunos datos pueden no ser 100% fiables debido a la rareza y complejidad para clasificar los mismos<sup>14</sup>.

**Tabla 1.** Tasa de supervivencia a 5 años para pacientes de Glioma. Adaptada de <sup>14</sup>

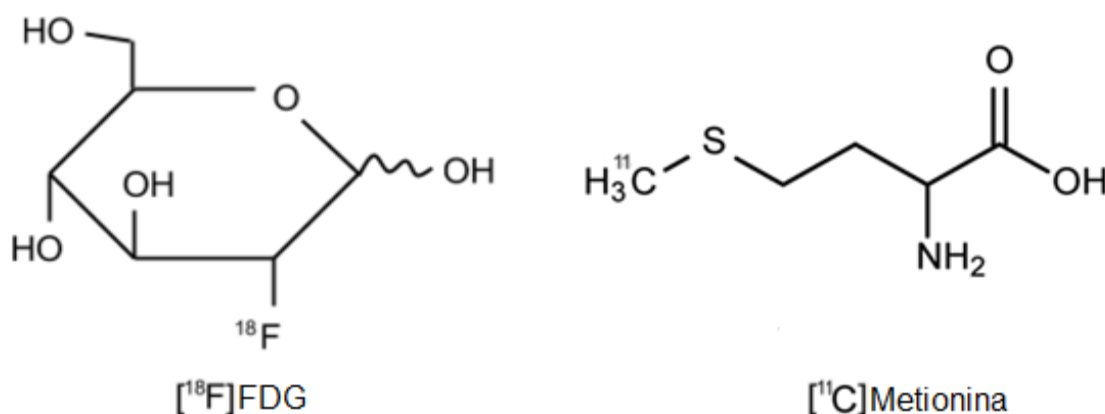
TIPO DE GLIOMA	TASA DE SUPERVIVENCIA A 5 AÑOS		
	Edad		
	20-44	45-54	55-64
ASTROCITOMA DE BAJO GRADO	65%	43%	21%
ASTROCITOMA ANAPLÁSICO	49%	29%	10%
GLIOBLASTOMA MULTIFORME	17%	6%	4%
OLIGODENDROGLIOMA	85%	79%	64%
OLIGODENDROGLIOMA ANAPLÁSICO	67%	55%	38%
EPENDIMOMAS	91%	86%	85%

## DIAGNÓSTICO Y TERAPIA

El diagnóstico constituye un paso limitante para la supervivencia del paciente que presenta un glioma, por lo que la búsqueda del diagnóstico precoz tiene prioridad clínica. El perfeccionamiento progresivo de los estudios imagenológicos a partir de los años 70 revolucionó el estudio del cerebro y permitió un mayor detalle anatómico de las estructuras del SNC. Por ejemplo, la resonancia magnética nuclear (RMN) permite la detección de tumores y ofrece detalles morfológicos de la lesión, demarca sus bordes, la forma, e incluso diferencia las distintas partes ocultas del tumor después del uso de contraste endovenoso. A su vez proporcionan información sobre fenómenos secundarios como edema, hemorragia, necrosis y signos de aumento de la presión intracraneal.

La tomografía por emisión de positrones (PET) ha aportado un valor adicional en la evaluación de pacientes con gliomas<sup>25</sup> ya que contribuyó a diferenciar los gliomas de otras entidades tumorales<sup>26,27</sup>. La técnica de PET se basa en el uso de ligandos radiactivos (radiotrazadores) que pueden marcar estructuras moleculares específicas en organismos vivos. Esta técnica permite visualizar y cuantificar la actividad metabólica de las células en órganos específicos, aportando información directa sobre la bioquímica y la función del área, brindando una caracterización a nivel metabólico del tumor en cuestión. La información morfológica es aportada por la tomografía computarizada incluida en las cámaras PET (PET/CT).

Para la obtención de imágenes de gliomas, se ha sugerido que varios radiotrazadores son útiles para diferentes propósitos: diagnóstico, clasificación, evaluación de recurrencia, planificación y seguimiento del tratamiento. Existen diversos enfoques utilizando trazadores que se valen de características del tumor como la alta tasa de proliferación ([<sup>18</sup>F]fluortimidina), nivel de oxigenación del tejido ([<sup>18</sup>F]fluoromisonidazol, marcador de hipoxia), altas tasas de síntesis proteica ([<sup>11</sup>C]metionina) y metabolismo de glucosa ([<sup>18</sup>F]fluorodesoxiglucosa), siendo estos dos últimos los más usados en la clínica (**figura 7**). Sin embargo, existe un uso preferente por la [<sup>11</sup>C]metionina debido a que las altas tasas metabólicas basales de glucosa del SNC dificulta el logro de un buen contraste utilizando [<sup>18</sup>F]fluorodesoxiglucosa.<sup>28</sup>



**Figura 7.** Estructura química de los principales radiofármacos utilizados en PET para imagenología de gliomas.

Los tratamientos de preferencia de los gliomas en adultos son la cirugía y la radioterapia. De ser posible, la remoción quirúrgica siempre es el primer paso independientemente del tipo de glioma. Si bien las cirugías

<sup>25</sup> Waldman AD, Jackson A, Price SJ, Clark CA, Booth TC, Auer DP, Tofts PS, Collins DJ, Leach MO, Rees JH. *Quantitative imaging biomarkers in neuro-oncology*. Nat Rev Clin Oncol. 2009 Aug;6(8):445-54.

<sup>26</sup> Petrirena GJ, Goldman S, Delattre JY. *Advances in PET imaging of brain tumors: a referring physician's perspective*. Curr Opin Oncol., 2011, 23(6):617-23.

<sup>27</sup> Messa C, Bettinardi V, Picchio M et al. *PET/CT in diagnostic oncology*. Q J Nucl Med Mol Imaging. 2004. 48:66-75.

<sup>28</sup> la Fougère C, Suchorska B, Bartenstein P, Kreth FW, Tonn JC. *Molecular imaging of gliomas with PET: Opportunities and limitations*. Neuro Oncol. 2011 Aug; 13(8): 806–819.

son generalmente de alto riesgo para el paciente, pueden dejar secuelas importantes y comprometer sus capacidades motoras o cognitivas, los recientes avances técnicos en radiología y neurocirugía han permitido disminuir la morbimortalidad asociada a este tipo de intervenciones mediante el uso de RMN funcional, técnicas de espectroscopia y monitoreo electrofisiológico intraoperatorio. Así mismo, los progresos en la aplicación de radioterapia y, más recientemente la radiocirugía, han permitido disminuir considerablemente el grado de neurotoxicidad a largo plazo. De esta manera, actualmente es posible operar a pacientes que hace algunos años eran considerados inoperables.

Usualmente, la cirugía es suficiente por sí sola para el tratamiento de gliomas de grado I. La quimioterapia está indicada para el tratamiento de gliomas de grado II o superior, y su uso en pacientes adultos ha sido el objeto de múltiples estudios multicéntricos en los últimos años<sup>29,30</sup> debido a las limitaciones que ha demostrado. Las dificultades para obtener resultados exitosos con quimioterapias utilizadas en tumores de otros órganos se explica en parte por la presencia de la barrera hematoencefálica que limita el ingreso de los fármacos dentro del SNC<sup>31</sup>.

A pesar de todos los avances tanto en el área diagnóstica como terapéutica, generalmente los gliomas siguen siendo tumores de mal pronóstico y los pacientes muestran tendencia presentar recidivas de mayor agresividad, observándose recurrencia aún en caso de recesión completa de un hemisferio cerebral<sup>32,33</sup>. La naturaleza infiltrante, la falta de efectividad y las limitaciones en la quimioterapia<sup>34</sup> son factores relacionados con la progresión del glioma y con su reincidencia. Al día de hoy, se reconoce que pese a los avances existen múltiples aspectos de la biología de los gliomas que necesitan estudio y que son relevantes para el avance del conocimiento, de la terapia y el diagnóstico de gliomas.

## **MODELOS ANIMALES DE CARCINOGENESIS**

### **GENERALIDADES**

El desarrollo de modelos representativos de los distintos tipos de cáncer, tanto *in vitro* como *in vivo*, es necesario para el entendimiento de cómo se originan y evolucionan estos neoplasmas así como para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y de diagnóstico. Un modelo animal inducido permite estudiar

---

<sup>29</sup> Drappatz J, Schiff D, Kesari S, Norden AD, Wen PY. *Medical management of brain tumor patients*. *Neurol Clin*, 2007, 25:1035-1071.

<sup>30</sup> Kaloshi G, ouaich-Amiel A, Diakite F, Taillibert S, Lejeune J, Laigle-Donadey F, et al. *Temozolomide for lowgrade gliomas: predictive impact of 1p/19q loss on response and outcome*. *Neurology*, 2007, 68:1831-1836.

<sup>31</sup> Reyes-Botero GA. *Gliomas in adults: diagnostic and therapeutical approach*. *Acta Neurol Colomb*, 2008, 25:34-41.

<sup>32</sup> Lassman AB, Holland EC. *Glioblastoma Multiforme - Past, Present, and Future*. *US Oncology Review*, 2005; 1(1):109-111

<sup>33</sup> Gardner WJ et al. *Residual functioning following hemispherectomy for tumour and for infantile hemiplegia*. *Brain*, 1955; 78(4): pp. 487-502.

<sup>34</sup> Payne LS, Huang PH. *The pathobiology of collagens in glioma*. *Mol Cancer Res*. 2013; 11(10):1129-40

la formación del neoplasma (gliomagénesis) desde un principio, identificando la progresión del mismo y las diferentes alteraciones que va sufriendo e induciendo en el microambiente circundante. Además, los modelos animales representativos del desarrollo de la enfermedad son necesarios para ahondar en procesos complejos como la invasividad y la interacción con el entorno que son difíciles de implementar en cultivo celular.

Un buen modelo animal es aquel que muestra un balance entre la fidelidad al desarrollo de la enfermedad en humanos y la herramienta que represente para el investigador según sus propios objetivos<sup>35</sup>. El modelo ideal de cáncer debería mostrar una histopatología comparable a la que se observa en muestras tumorales incluyendo infiltración, angiogénesis y diseminación a distancia a medida que progresa la enfermedad. En los modelos a analizar, las vías de señalización prominentes en neoplasias humanas deberían estar igualmente preservadas, así como evidenciar heterogeneidad celular y molecular en los distintos estadios. A su vez, cuando sea posible, las interacciones estromales deben ser fieles a sus homólogos humanos. Además de estos aspectos, el modelo ideal debería desarrollar neoplasmas en períodos de tiempo cortos y mostrar una evolución predecible para permitir un monitoreo exhaustivo con el cual detectar fácilmente cualquier cambio<sup>36</sup>. Obviamente, no existe ningún modelo animal que satisfaga todos estos requerimientos altamente demandantes y cada modelo *in vivo* tiene distintas ventajas y desventajas, así como distintos usos preferenciales. Sin embargo, el uso de modelos experimentales animales es una herramienta valiosa para el estudio del cáncer.

En 1915, el patólogo K. Yamagiw publicó el primer trabajo experimental en carcinogénesis química reportando el desarrollo de papilomas y carcinomas en orejas de conejos luego de repetidas aplicaciones de alquitrán.<sup>37</sup> Tal como es de suponer, los primeros modelos tumorales animales que aparecieron fueron modelos de carcinogénesis química producidos por el suministro de sustancias químicas capaces de alterar la estructura del ADN introduciendo mutaciones y produciendo un aumento en la ocurrencia de neoplasias espontáneas respecto de animales control no inyectados. Desde entonces la exposición a ciertos agentes ambientales químicos, físicos (radiación) o biológicos (virus patógenos o flora microbiana)<sup>38</sup> han dado lugar a modelos útiles para estudios genéticos y preclínicos, así como para determinar el potencial carcinogénico o quimiopreventivo de varios compuestos químicos. La espontaneidad de los tumores que aparecen en los modelos inducidos junto a su desarrollo en animales inmunocompetentes y en un estroma no modificado hacen que estos modelos sean de gran valor en la investigación científica aún hoy. Sin embargo, es evidente que existen limitaciones en los modelos de inducción por exposición a químicos u otros factores

---

<sup>35</sup>Greek R, Menache A. *Systematic reviews of animal models: methodology versus epistemology*. Int J Med Sci. 2013;10(3):206-21

<sup>36</sup>Vandamme TF. *Use of rodents as models of human diseases*. J Pharm Bioallied Sci. 2014 Jan;6(1):2-9

<sup>37</sup>Oliveira PA, Colaco A, Chaves R., Guedes-Pinto H, De-la-Cruz L.; Lopes C. *Chemical carcinogenesis*. Annals of the Brazilian Academy of Sciences, 2007, 79(4): 593-616.

<sup>38</sup>Hardisty JF. *Factors influencing laboratory animal spontaneous tumor profiles*. Toxicol. Pathol., 1985, 13: 95-104.

ambientales. La latencia y la penetrancia variable y muchas veces la restricción en los tipos de tumor que pueden aparecer en los modelos inducidos, así como el manejo de sustancias tóxicas, dificultan la implementación de estos modelos en el laboratorio<sup>38</sup>.

En la década del 70 el desarrollo de modelos basados en el trasplante de tejidos o células de origen tumoral (que pueden ser incluso de origen humano, xenotrasplantes) permitió contar con tejido tumoral establecido *in vivo* en animales inmunodeprimidos de una forma fácil y rápida<sup>39</sup>. Si bien los modelos de trasplante permiten hacer un abordaje complementario a los modelos de inducción ambiental, a la hora de comparar los tumores producidos por este abordaje con tumores humanos derivados de pacientes, tumores autóctonos del animal o tumores inducidos espontáneamente por carcinogénesis química, se observa una desviación de la arquitectura tumoral típica y una menor heterogeneidad genética. Las alteraciones observadas respecto a las características de los tumores espontáneos pueden deberse a la modificación del microambiente donde se desarrolla el tumor, incluyendo dentro de esto: interacciones con otras células del tejido en donde se desarrollará el tumor, elementos de la vasculatura y del sistema inmune<sup>40,41</sup>. Elementos que pueden ser relevantes en la evaluación terapéutica de nuevos compuestos, por lo que resulta difícil observar concordancia entre resultados obtenidos en modelos de trasplante de células y lo que se ve en la clínica<sup>42</sup>.

Actualmente los modelos genéticamente modificados constituyen la aproximación más sofisticada de cáncer y muchos de ellos logran representar fielmente las características moleculares y fisiopatológicas de la enfermedad<sup>43</sup>. Sin embargo, sus limitaciones están asociadas a cada modelo en particular, pero en general, están relacionadas a la aparición de más de un tumor primario y la dificultad para producirlos.

Desde las primeras aproximaciones utilizando sustancias químicas y su efecto sobre la aparición de neoplasmas, se ha observado un gran avance en el tema, siendo reflejo de ello el establecimiento de múltiples líneas celulares derivadas de tumores humanos y de neoplasias inducidas en modelos animales de carcinogénesis. Aun cuando los modelos celulares *in vitro* facilitan la implementación de *screening* de alta eficiencia (*high-throughput screening*), que permiten evaluar una gran cantidad de compuestos con alta diversidad química, y el descubrimiento de genes implicados en la transformación de las células tumorales, los modelos animales siguen siendo imprescindibles. Además, como el cáncer es una enfermedad muy

---

<sup>39</sup> Kendall SD, Adam SJ & Counter CM. *Genetically engineered human cancer models utilizing mammalian transgene expression*. Cell Cycle, 2006, 5: 1074–1079.

<sup>40</sup> Sikder H. *et al.* *Disruption of Id1 reveals major differences in angiogenesis between transplanted and autochthonous tumors*. Cancer Cell, 2003, 4: 291–299.

<sup>41</sup> Becher OJ & Holland EC. *Genetically engineered models have advantages over xenografts for preclinical studies*. Cancer Res., 2006, 66: 3355–3358.

<sup>42</sup> Johnson JI *et al.* *Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials*. Br. J. Cancer, 2001, 84: 1424–1431.

<sup>43</sup> Jonkers J & Berns A. *Conditional mouse models of sporadic cancer*. Nature Rev. Cancer, 2002, 2: 251–265

compleja con interacciones intrincadas entre las células mutantes, células normales, elementos del estroma (tejido circundante y sus componentes) y el sistema inmune<sup>44</sup> los modelos animales representativos del desarrollo de la enfermedad son necesarios para ahondar en procesos complejos como angiogénesis y metástasis (difícilmente trasladables a ensayos en cultivo celular) y para profundizar en la aplicación de nuevas estrategias de terapia. El propósito final por el cual los modelos animales son desarrollados es la mejora e implementación de nuevas estrategias terapéuticas, permitiendo por ejemplo, la evaluación de la acción de nuevos fármacos que han mostrado resultados prometedores *in vitro*, permitiendo un abordaje interfásico antes de dirigirse efectivamente al plano clínico.

## MODELOS ANIMALES DE GLIOMA

EL desarrollo de modelos de tumores cerebrales es un área que ha estado bajo intenso desarrollo desde los últimos 60 años, en donde se ha hecho un progreso y logrado mejoras significativas recientemente con el establecimiento de modelos de glioblastoma altamente invasivos. En la actualidad está claro que ninguno de los modelos animales actuales refleja plenamente la patología humana. Sin embargo, los diversos sistemas disponibles han proporcionado información importante sobre mecanismos específicos de desarrollo de estos tumores<sup>45</sup>.

Diversos organismos han servido para reproducir aspectos relevantes de la biología de los gliomas, incluyendo a la *Drosophila melanogaster*<sup>46</sup> y modelos transgénicos y xenogénicos en pez cebra (*Danio rerio*)<sup>47,48</sup>. Dentro de los modelos desarrollados en mamíferos, el ratón (*Mus musculus*) es preferido debido a que permite la generación de modelos genéticamente modificados que recrean la patología humana con distintos grados de sofisticación y fidelidad. Los modelos de rata (*Rattus norvegicus*) en su mayoría no están genéticamente modificados, por lo que el *targeting* de una cierta vía y la exploración de interacciones tumor-estroma es preferentemente estudiado en los modelos de ratón<sup>49</sup>. Sin embargo, los modelos de rata se han utilizado para evaluar numerosas modalidades de tratamiento ya que en ciertos aspectos

---

<sup>44</sup> Hanahan, D & Weinberg RA. *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000, 100: 57–70.

<sup>45</sup> Huszthy PC, Daphu I, Niclou SP, Stieber D, Nigro JM, Sakariassen PØ, Miletic H, Thorsen F, Bjerkvig R. *In vivo models of primary brain tumors: pitfalls and perspectives*. Neuro Oncol. 2012 Aug;14(8):979-93

<sup>46</sup> Read RD. *Drosophila melanogaster as a model system for human brain cancers*. Glia, 2011, 59(9): 1364–1376.

<sup>47</sup> Berghmans S, Murphey RD, Wienholds E, Neuberg D, Kutok JL, Fletcher CD., et al. *Tp53 mutant zebrafish develop malignant peripheral nerve sheath tumors*. PNAS, 2005 102(2): 407–412.

<sup>48</sup> Yang XJ, Cui W, Gu A, Xu C, Yu SC, Li TT., et al. *A novel zebrafish xenotransplantation model for study of glioma stem cell invasion*. PLoS One, 2013, 8(4): e61801.

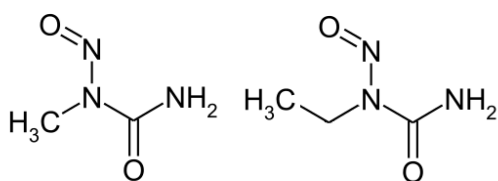
<sup>49</sup> Reilly KM, Rubin JB, Gilbertson RJ, Garbow JR., Roussel MF & Gutmann DH. *Rethinking brain tumors: The fourth mouse models of human cancers consortium nervous system tumors workshop*. Cancer Research, 2008, 68(14) 5508–5511.

reproducen mejor la enfermedad humana<sup>50</sup>. Además, el tamaño del animal mejora su uso como modelo de enfermedad, no sólo debido a la mejor capacidad para realizar procedimientos quirúrgicos, sino también al tamaño proporcional de los órganos y sus subestructuras. Esto es particularmente importante en el SNC y en el empleo de técnicas imagenológicas donde la discriminación espacial es una variable limitante. El tamaño del cerebro de la rata, más de tres veces mayor que el de ratón, puede llegar a tolerar volúmenes mayores a la hora de inyectar compuestos o células; a su vez, su grueso cráneo posibilita explorar nuevas técnicas de trasplante y *delivery* de agentes terapéuticos y nuevos fármacos<sup>51</sup>.

Además de la inyección de células en individuos inmunocomprometidos, es posible realizar un encare único de trasplante singénico en ratas, donde se induce químicamente la aparición de gliomas en el donante y luego se transfiere por inyección estereotáxica parte de uno de esos gliomas a un receptor distinto, pero genéticamente idéntico, minimizando el riesgo de rechazo y permitiendo el uso de animales con su sistema inmune intacto<sup>52</sup>.

Actualmente, los modelos más usados para los estudios de tumores del SNC se basan en el trasplante de células tumorales de cerebro humanas o de roedores que son cultivadas en animales receptores inmunodeficientes. También se utiliza la inducción de nuevos tumores cerebrales en roedores con mutágenos, como la nitrosourea<sup>53</sup>. Desafortunadamente, ambos modelos tienen inconvenientes, por lo que la investigación en este continúa siendo de vital importancia para poder realizar la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas anti-glioma.

## INDUCCIÓN QUÍMICA DE GLIOMAS



**Figura 8.** Estructura química de MNU y ENU, agentes más utilizados para la inducción de gliomas.

El desarrollo de modelos de inducción de tumores gliales por agentes químicos comenzó en la década del 60. Desde entonces, las nitrosoureas demostraron ser la mejor alternativa para inducir selectivamente la aparición de gliomas y los modelos inducidos por estos agentes alquilantes se encuentran entre los preferidos para la investigación neuro-oncológica con fines básicos,

<sup>50</sup> Iannaccone PM, Jacob HJ. *Rats! Dis Model Mech.* 2009 May-Jun;2(5-6):206-10.

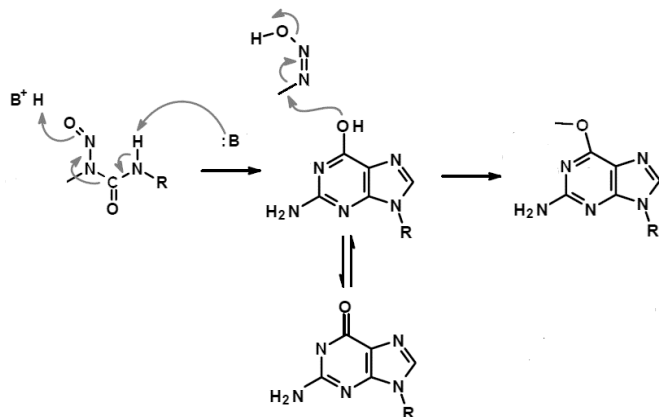
<sup>51</sup> Saini M, Roser F, Samii M & Bellinzona M. *A model for intratumoural chemotherapy in the rat brain.* Acta Neurochirurgica, 2004, 146(7): 731–734.

<sup>52</sup> Wechsler W, Ramadan MA, Pfeiffer SE. *Morphologic and biochemical characteristics of transplantable neurogenic tumors induced by N-ethyl-N-nitrosourea in inbred BD IX rats.* J Natl Cancer Inst. 1979;62(4):811–817

<sup>53</sup> Hesselager G, Holland EC. *Using mice to decipher the molecular genetics of brain tumors.* Neurosurgery. 2003 Sep;53(3):685-94.



de diagnóstico o terapéuticos<sup>54</sup>. Existen varios modelos tumorales producidos por la exposición de roedores a *N*-metilnitrosourea (MNU) o *N*-etilnitrosourea (ENU) (**figura 8**).



**Figura 9.** Posible mecanismo de metilación de la guanina en posición O<sup>6</sup> por acción de MNU. Adaptado de<sup>56</sup>

Estos nitrosocompuestos alquilan las bases del ADN en un proceso en varios pasos que se inicia con la ruptura del carcinógeno bajo la influencia catalítica de un grupo tiol u otra base sin la necesidad de participación de una enzima<sup>55</sup>. El sitio así como el mecanismo y tasa de alquilación depende principalmente del agente alquilante en cuestión. En el caso de MNU la posición O<sup>6</sup> de la guanina es el blanco preferencial (**figura 9**), mientras que en el caso de

ENU otras bases son O-alquiladas con la misma frecuencia. Durante la duplicación celular estos cambios en las bases promueven eventos mutagénicos por la adquisición de nuevas propiedades químicas que promueven apareamientos incorrectos (por ejemplo una O<sup>6</sup>-metilguanina puede aparearse con una timidina, en vez de con una citosina) que pueden servir de punto de partida al proceso oncogénico<sup>56</sup>.

Se ha postulado que la selectividad por el sistema nervioso de estos agentes alquilantes es consecuencia de un proceso de reparación defectuoso que involucra directamente el mecanismo de acción de las nitrosoureas en el sistema nervioso, en donde la O<sup>6</sup>-alquilguanina químicamente estable no es rápidamente reparada tal como ocurre en los demás tejidos del organismo<sup>57</sup>. La carencia en el SNC de un sistema, que involucra la presencia de proteínasceptoras de grupos alquilo que transfieren los grupos alquilo a un residuo de cisteína propio desde las guaninas modificadas, podría explicar la acumulación de bases

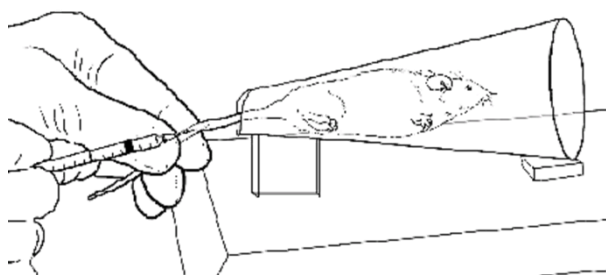
<sup>54</sup> Bilzer T, Reifenger G, Wechsler W. *Chemical induction of brain tumors in rats by nitrosoureas: molecular biology and neuropathology*. Neurotoxicol Teratol. 1989; 11(6):551-6.

<sup>55</sup> Kleihues P, Rajewski MF. *Chemical neuro-oncogenesis: Role of structural DNA modifications, DNA repair and neural target cell population*. Prog. Exp. Tumor Res. 1984, 27:1-16.

<sup>56</sup> Loechler EL, Green CL, Essigmann GM. *In vivo mutagenesis by O<sup>6</sup>-methylguanine built into unique site in a viral genome*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, 81:6271~5275.

<sup>57</sup> Goth R, Rajewski MF. *Molecular and cellular mechanisms associated with pulsecarcinogenesis in the rat nervous system by ethyl-nitrosourea. Ethylation of nucleic acids and elimination of rates of ethylated bases from DNA of different tissues*. Z. Krebsforsch. 1974, 82:37-64

alteradas en el SNC y la selectividad con la que se induce el tumor mediante agentes como MNU y ENU<sup>58</sup>. Existen varios modelos inducidos por MNU y ENU que tienen características neuropatológicas similares a los gliomas malignos en humanos (pleomorfismo celular, actividad mitótica elevada, microvascularización, invasión local, necrosis) y que varían el tiempo de exposición, la forma de administración de carcinógeno y el momento en la vida del animal en el que es suministrado<sup>45</sup>. Si bien hay modelos en donde es posible inducir gliomas en ratas adultas, suministrando una dosis de 10 ppm en el agua de beber durante 20 semanas y aparecen tumores con una latencia de 20 a 50 semanas<sup>59</sup> esto conlleva el uso sostenido de un agente altamente tóxico por largos períodos de tiempo, por lo que es difícil de implementar. Un modelo más popular, que involucra la utilización de una cantidad mucho menor de carcinógeno fue propuesto por



**Figura 10.** Esquema de administración del carcinógeno en el modelo de Druckrey y colaboradores<sup>60</sup>

Druckrey y colaboradores en 1966<sup>60</sup>. Este modelo se basa en la inyección intravenosa (**figura 10**) de una solución de ENU en una hembra preñada en el día 21 de gestación, exponiendo por vía transplacentaria a los fetos durante las etapas finales de gliogénesis y de la diferenciación de la glía<sup>61</sup>. Este período de vulnerabilidad y cambios del SNC sumado a la deficiencia en los mecanismos de reparación presentes en dicho sistema posibilitan que una

única inyección a la madre sea suficiente para provocar la aparición de neoplasias gliales en un 100% de las crías y en un lapso de tiempo que depende de la dosis de ENU suministrada<sup>62</sup>. Si bien este modelo presenta la desventaja de la administración del carcinógeno a una hembra gestante en estado avanzado (lo que impide por ejemplo utilizar anestesia profunda), el mismo ha mostrado ser de amplia utilidad, empleándose a lo largo de los años para estudios de diversa índole entre los que se incluyen la evaluación

<sup>58</sup> Rajewski MF, Augenticht LH, Biessmann H, Goth R, Htilser DF, Laerum OD, Lomakina LY. *Nervous-system specific carcinogenesis by ethyl-nitrosourea in the rat: molecular and cellular aspects*. Orig. Hum. Cancer 1977; 12:709-725

<sup>59</sup> Rushing EJ, Watson ML, Schold SC, Land KJ, Kokkinakis DM. *Glial tumors in the MNU rat model: induction of pure and mixed gliomas that do not require typical missense mutations of p53*. J Neuropathol Exp Neurol. 1998 Nov;57(11):1053-60.

<sup>60</sup> Druckrey H, Ivankovic S, Preussmann R. *Teratogenic and carcinogenic effects in the offspring after a single injection of ethylnitrosourea to pregnant rats*. Nature, 1966, 210: 1378-1379

<sup>61</sup> van den Aamele J, Tiberi L, Vanderhaeghen P, Espuny-Camacho I. *Thinking out of the dish: what to learn about cortical development using pluripotent stem cells*. Trends Neurosci. 2014 Jun;37(6):334-42.

<sup>62</sup> Zook BC, Simmens SJ. *Neurogenic tumors in rats induced by ethylnitrosourea*. Exp Toxicol Pathol. 2005; 57(1):7-14.

de nuevos agentes con fines diagnósticos<sup>63</sup>, y la evaluación del efecto terapéutico y quimiopreventivo de compuestos nuevos o compuestos conocidos empleados con otros propósitos terapéuticos<sup>64</sup>.

Los tumores inducidos por agentes mutagénicos como NMU o ENU crecen dentro del tejido cerebral y desde un punto de vista histopatológico son reminiscentes de los gliomas humanos. Sin embargo, como los agentes carcinogénicos pueden causar mutaciones al azar en cualquiera de los genes del organismo, el perfil genético de los tumores inducidos es desconocido y difiere entre los tumores generados, lo que impide conocer la causa primaria de los gliomas. Esta variabilidad de blancos provoca que el método de inducción química sea poco reproducible<sup>53</sup>. Por tanto, la principal desventaja de los modelos que utilizan carcinógenos químicos es su baja reproducibilidad, dado que los tumores inducidos son de perfil genético desconocido *a priori* y usualmente difieren en tipo, localización y latencia, pudiendo incluso ocasionar la generación de más de un tumor primario en los animales expuestos a las nitrosoureas<sup>64</sup>. En la **figura 11** se muestran algunos de los resultados aleatorios producidos por la administración de ENU en ratas<sup>65</sup>. La **figura 11A** muestra que ENU ocasiona la aparición de un schwannoma en un nervio lumbar, en la **figura 11B** se observa un glioma mixto de alto grado donde es posible reconocer rasgos de un astrocitoma de alto grado (núcleos grandes y polilobulados, flecha amarilla) entremezclado con zonas claramente reminiscentes de un oligodendroglioma humano con células uniformes con nucleolo marcado y el característico halo perinuclear. En la **figura 11C** se muestra un glioma de bajo grado invadiendo localmente una estructura mielinizada<sup>65</sup>.

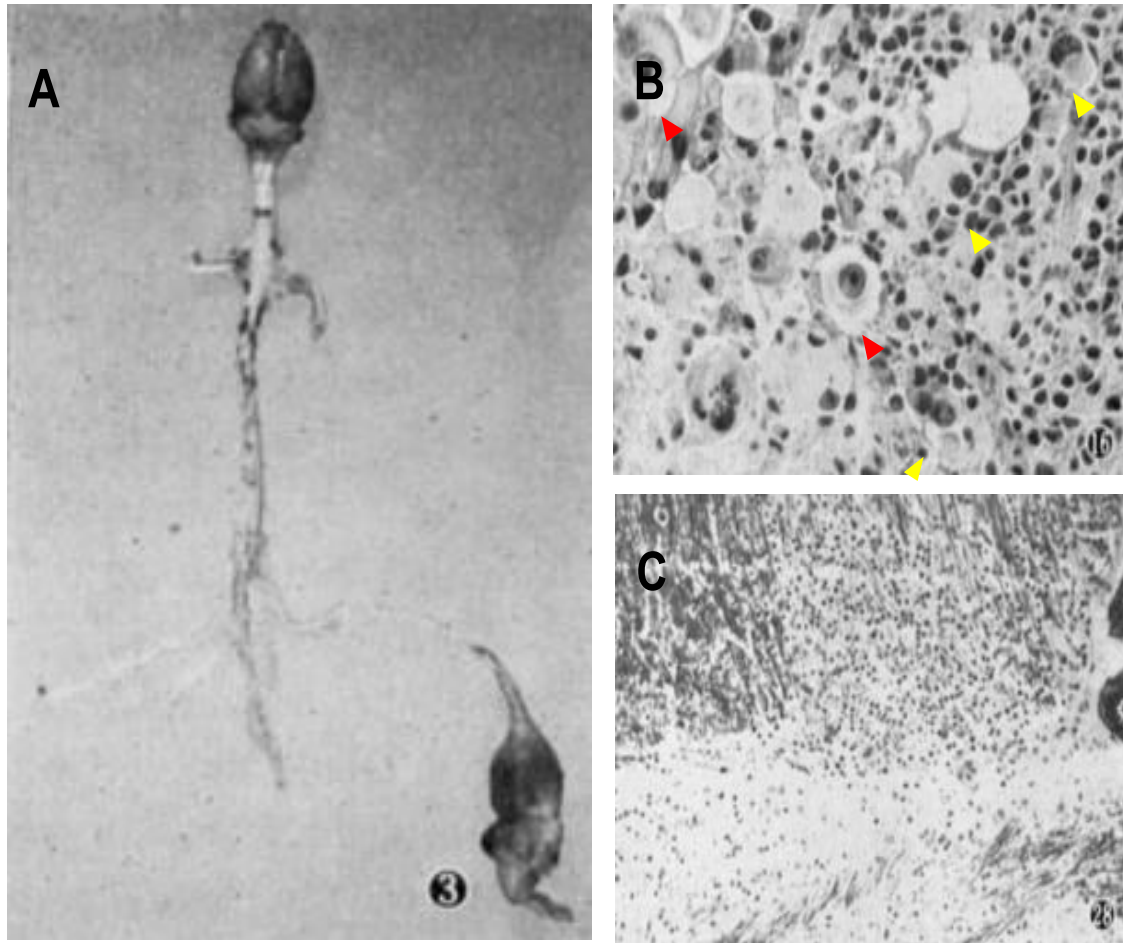
Los modelos inducidos químicamente tienen la desventaja de producir neoplasias que varían en número y tipo, con una latencia prolongada y variable desde la administración del carcinógeno a la aparición macroscópica del tumor o la muerte subsecuente. Estas características, sumadas a los peligros para la salud derivados del manejo de dichas sustancias hacen que estos modelos hayan caído en desuso y fueran paulatinamente reemplazados por modelos celulares.

---

<sup>63</sup> Kish PE, Blaivas M, Strawderman M, Muraszko KM, Ross DA, Ross BD, McMahon G. *Magnetic resonance imaging of ethylnitrosourea-induced rat gliomas: a model for experimental therapeutics of low-grade gliomas*. J Neurooncol. 2001, 53(3):243-57.

<sup>64</sup> Ross DA, Kish PE, Muraszko KM, Blaivas M, Strawderman M. *Effect of dietary vitamin A or N-acetylcysteine on ethylnitrosourea-induced rat gliomas*. J Neurooncol. 1998, 40(1):29-38.

<sup>65</sup> Maggio WW. *Rodent glioma models*. Methods in Neuroscience, 1996, 39.



**Figura 11.** Distintos gliomas inducidos por ENU, adaptado de <sup>65</sup>. A- Schwannoma de nervio lumbar. B- Glioma mixto. Con flechas amarillas se señalan núcleos atípicos característicos de gliomas de alto grado mientras que en flechas rojas se señalan células con halo peri nuclear características en los oligodendrogliomas. C- Glioma de bajo grado.

## MODELOS DE TRASPLANTE DE CÉLULAS

Los modelos de trasplante de células de glioma, en general, tienen períodos de latencia mucho más cortos, un mejor control sobre la localización del tumor, producen tumores únicos e involucran un menor costo<sup>45</sup>. Varias líneas tumorales gliales han sido generadas a partir de tumores inducidos por nitrosocompuestos. Por ejemplo, a partir del modelo de inyección de ENU en hembras gestantes se generaron las líneas altamente invasivas RG2 y F98<sup>66</sup>. La exposición repetida a MNU en distintas cepas de rata dio origen a distintas líneas como la CNS-1 (obtenida a partir de ratas Lewis), la 9L (derivada de un gliosarcoma desarrollado en ratas Fischer 344, siendo una de las mejores para trasplante) y C6 (derivada de

astrocitoma)<sup>66</sup>. Poder contar con líneas celulares bien caracterizadas como las mencionadas ofrece ventajas significativas en cuanto a predictibilidad y correlación de resultados *in vitro*.

Uno de los requerimientos que presentan la implementación de los modelos celulares es el requerimiento de una manipulación quirúrgica compleja. Inicialmente se realizaban modelos ectópicos donde las células se inyectaban en forma subcutánea fuera del órgano o región donde se generaría el cáncer. Sin embargo, para el desarrollo de tumores cerebrales el implante celular ortotópico es el que produce mejores aproximaciones. De hecho, la inyección estereotáxica intraparenquima cerebral de células tumorales por lo general da como resultado una incidencia del orden de 90% de tumores intracerebrales en la mayoría de los modelos ya utilizados, por lo que se ha convertido en la técnica estándar para el trasplante intracerebral de líneas celulares de glioma desde finales de los 80<sup>67</sup>. No obstante, algunos aspectos técnicos del procedimiento de trasplante son esenciales para la reproducibilidad del modelo, independientemente de la línea celular específica utilizada. Kobayashi y sus colegas fueron los primeros en demostrar las ventajas de la administración estereotáxica en inyección a mano alzada<sup>68</sup>. El primer procedimiento, aunque rápido, parece estar asociado con la aparición del tumor por fuera del cerebro. La administración estereotáxica de las células directamente en el cerebro de los roedores, con una retirada lenta de la aguja de inyección, ha minimizado el riesgo de diseminación extracerebral.

Además de la técnica de trasplante, existen factores asociados al huésped que parecen ser importantes en el éxito del trasplante de glioma, tal como la edad y la cepa de la rata. La edad del huésped es importante, dentro de una misma cepa y para la misma línea celular, los animales neonatales tienden a aceptar el trasplante intracerebral de las células tumorales más fácilmente que los animales adultos, disminuyendo la eficiencia de los modelos con la edad<sup>69</sup>. Sin embargo, en sistemas singénicos que utilizan huéspedes altamente endogámicos y líneas celulares de glioma derivadas de la misma cepa, la tasa de éxito, incluso con animales adultos, se aproxima al 100%, lo que indica que los factores genéticos son más importantes que la edad en la incidencia tumoral. El sexo de la rata no parece influir en el éxito del trasplante de glioma en el cerebro<sup>70</sup>, aunque la mayoría de los estudios utilizan machos.

Otro aspecto a tener en cuenta relacionado a la eficiencia de la producción de tumores es la cantidad de células inoculadas por inyección. En la mayoría de los trabajos se utilizan cantidades de células que van desde 10.000 al 1.000.000, en volúmenes de 2 a 50  $\mu\text{L}$ , aunque se recomienda el uso de volúmenes

---

<sup>66</sup> Barth RF, Kaur B. *Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas*. J Neurooncol. 2009; 94(3):299-312.

<sup>67</sup> Rama B, Spoerri O, Holzgraefe M, Mennel HD. *Current brain tumour models with particular consideration of the transplantation techniques. Outline of literature and personal preliminary results*. Acta Neurochir (Wien). 1986;79(1):35-41.

<sup>68</sup> Kobayashi N, Allen N, Clendenon NR, Ko LW. *An improved rat brain-tumor model*. J Neurosurg. 1980 Dec;53(6):808-15.

<sup>69</sup> Wilson CB, Bates EA. *The Experimental Biology of Brain Tumors*. Charles C. Thomas ediciones, 1ª edición. Springfield. 1973, pág 19-56.

<sup>70</sup> Furuta T, Wilkinson HA, Fujiwara T. *Growth of 9-L and RT-9 gliosarcoma in female rats*. J Neurooncol. 1987;5(1):73-5.

pequeños para minimizar el aumento de presión en el tejido. Auer y colaboradores estudiaron la dosis-respuesta en la producción de tumores de células C6 implantadas intracerebralmente en ratas Wistar neonatales. Trabajando en un rango de dosificación que abarcaba de 5 células a órdenes de 100.000 células se observó consistentemente una incidencia de tumor en 100% de los casos cuando la dosis era superior a 10.000 células. Administraciones de menos de 500 células no produjeron ninguna formación de tumor<sup>71</sup>.

La línea C6 (ATCC® CCL-107™ - **figura 12**) deriva originalmente de un astrocitoma producido en ratas Wistar que fueron expuestas repetidas veces a MNU durante un período de 8 meses<sup>72</sup>. La línea se encuentra bien caracterizada desde el punto de vista de su repertorio molecular. En la misma se encuentra incrementada la expresión de genes notablemente afectados en los tumores humanos del SNC como el factor de crecimiento derivado de plaquetas  $\beta$  (PDGF $\beta$ ), factor de crecimiento epidérmico (EGFR), factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) y tirosina proteína quinasa receptora ErbB3, mientras que p53 permanece sin alterar. Por lo tanto, esta línea resulta muy efectiva para ensayar nuevas terapias de distinta naturaleza entre las que se incluyen las sustancias químicas, radiación, virus oncolíticos y que están dirigidas contra algunas de las vías desreguladas mencionadas anteriormente<sup>66</sup>. Debido a las características presentadas por las células C6, se han realizado muchos estudios utilizándolas en trasplante intracerebral. Sin embargo, los estudios que usan el modelo de C6 muestran fallas en la producción de tumores y tasas de supervivencia prolongadas no observadas en otros modelos singénicos, lo que sugiere la presencia de cierta inmunogenicidad de las células debido a que el rechazo inmunológico puede estar activo en algunos animales. Estos problemas han limitado la utilidad del modelo C6 en los estudios terapéuticos. Sin embargo, se han implementado modelos útiles para estudiar la fisiopatología de los gliomas por trasplante intracerebral de células C6 en ratas Sprague-Dawley<sup>73</sup>, Long-Evans<sup>74</sup> y Wistar<sup>71,75</sup>,

---

<sup>71</sup> Auer RN, Del Maestro RF, Anderson R. *A simple and reproducible experimental in vivo glioma model*. Can J Neurol Sci. 1981 Nov;8(4):325-31.

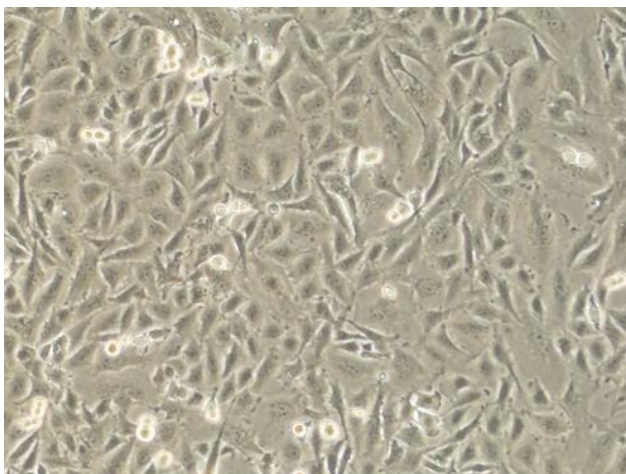
<sup>72</sup> Benda P, Lightbody J, Sato G, et al. *Differentiated rat glial cell strain in tissue culture*. Science. 1968, 161:370–371

<sup>73</sup> Bernstein JJ, Goldberg WJ, Laws ER Jr, Conger D, Morreale V, Wood LR: *C6 glioma cell invasion and migration of rat brain after neural homografting: ultrastructure*. Neurosurgery 1990;26:622-628

<sup>74</sup> Mokry J, Nemecek S, Adler J, Dedic K. *Inoculation of C6 cell suspension into the brain of adult rats: immunohistochemical study*. Funct Dev Morphol. 1993;3(3):175-80.

<sup>75</sup> Nagano N, Sasaki H, Aoyagi M, Hirakawa K. *Invasion of experimental rat brain tumor: early morphological changes following microinjection of C6 glioma cells*. Acta Neuropathol. 1993;86(2):117-25.

así como para estudiar correlaciones de resonancia magnética<sup>76</sup>, edema cerebral peritumoral<sup>77</sup>, capacidad invasiva de los gliomas<sup>75</sup> e incluso experimentos de terapia génica inyectando C6 en ratones nude<sup>78</sup>.



**Figura 12.** Apariencia al MO de la línea celular C6 (ATCC® CCL-107™) derivada de astrocitoma de rata. Tomada del catálogo de ATCC.

Con el fin de desarrollar modelos más reminiscentes de la patología humana, los trasplantes de células humanas de glioma de bajo pasaje en roedores fueron considerados hace ya mucho tiempo. Los primeros intentos de estudiar gliomas humanos in vivo se vieron obstaculizados debido al rechazo inmunológico de los xenotrasplantes<sup>69</sup>. La inmunosupresión con corticosteroides o irradiación, aunque útil en el trasplante de algunos tumores subcutáneamente, no es tan eficaz para prevenir el rechazo de xenoinjertos de

glioma humano en el cerebro de los roedores<sup>69</sup>. Para realizar xenotrasplantes ortotópicos se utilizan ratones *nude* atímicos, siendo éste mejor hospedador que los roedores inmunosuprimidos por los otros métodos. La producción tumoral en la ratón *nude* atímica es del 76-100%<sup>79,80</sup>. El hecho de que el porcentaje de rendimiento no sea siempre 100% puede reflejar probablemente diferencias en la biología del glioma humano particular implantado.

Otra estrategia que no ha sido tan explotada hasta el momento, radica en la transformación de cultivos primarios de células gliales y su posterior trasplante singénico en ratas de la misma colonia endogámica, las cuales poseen un *background* genético similar y por lo tanto tienen baja probabilidad de rechazar el trasplante. Hiraga y colaboradores han trabajado con cultivos primarios de astrocitos de cerebro entero de rata Wistar, tratándolos con una sola dosis de ENU superior a 150 µg/mL. Las colonias transformadas aparecieron 50 días después de la exposición al carcinógeno manteniendo las características

<sup>76</sup> Baba T, Moriguchi M, Natori Y, Katsuki C, Inoue T, Fukui M. *Magnetic resonance imaging of experimental rat brain tumors: histopathological evaluation.* Surg Neurol. 1990 Dec;34(6):378-82.

<sup>77</sup> Ohnishi T, Sher PB, Posner JB, Shapiro WR. *Increased capillary permeability in rat brain induced by factors secreted by cultured C6 glioma cells: role in peritumoral brain edema.* J Neurooncol. 1991 Feb;10(1):13-25.

<sup>78</sup> Chen SH, Shine HD, Goodman JC, Grossman RG, Woo SL. *Gene therapy for brain tumors: regression of experimental gliomas by adenovirus-mediated gene transfer in vivo.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Apr 12; 91(8): 3054–3057.

<sup>79</sup> Finkelstein SD, Black P, Nowak TP, Hand CM, Christensen S, Finch PW. *Histological characteristics and expression of acidic and basic fibroblast growth factor genes in intracerebral xenogeneic transplants of human glioma cells.* Neurosurgery. 1994 Jan;34(1):136-43.

<sup>80</sup> Adams C, Bullard DE, Bigner SH, Bigner DD. *Biology of Brain Tumor.* Martinus Nijhoff Publishers, Boston, 1986, pp. 97-105.

inmunohistoquímicas de los astrocitos primarios. Las células transformadas por este método mostraron un crecimiento rápido y altas densidades de saturación, formación de colonias en medio de suero bajo (2%) y dieron lugar a tumores cuando se inyectaron en ratones nude<sup>81,82</sup>. Sin embargo, los autores no han publicado una caracterización histológica precisa de ese modelo.

Las líneas de células de glioma trasplantadas han proporcionado la mayor parte de los datos necesarios para desarrollar la terapia anti-glioma estándar y experimental actual. Estos modelos de alo- y xenotrasplantes han sido elegidos por los experimentadores dado que son altamente reproducibles en individuos adultos. Algo a tener en cuenta sin embargo, es que los rasgos histopatológicos de los tumores inducidos usualmente difieren de los hallados en los tumores humanos<sup>79</sup>. Por ejemplo, los modelos de trasplante de células de GBM no son capaces de recapitular las características altamente infiltrativas de estos tumores. En la **figura 13** (adaptada de Silver et al.<sup>83</sup>) se distingue en el panel A un xenotrasplante de células U-87MG, las cuales están marcadas con un anticuerpo específico para nestina humana, mientras que en B, se distinguen células primarias de un GBM de un paciente marcadas con el mismo anticuerpo, las cuales recrean mejor el fenotipo infiltrante, algo que no es posible de lograr trasplantando líneas celulares establecidas derivadas de GBM. Claramente, el tumor en B no es una lesión discreta de bordes redondeados como en A, sino que es posible ver como las células lograron migrar fuera de la masa tumoral primaria. A mayor aumento este fenómeno es distinguible prestando atención a la disposición de los astrocitos (marcados con GFAP) en los bordes del neoplasma en el primer caso y entremezclados con las células tumorales en el segundo.

Ha de considerarse además, que dado que las células tumorales son susceptibles de ataques inmunológicos por parte del hospedero, la utilización de organismos receptores inmunosuprimidos es extendida, lo que impide que las interacciones tumor-microambiente se produzcan tal como ocurre en los pacientes y posiblemente tenga influencia en los posibles *outputs* a la hora de extrapolar los resultados observados en modelos animales a la clínica.

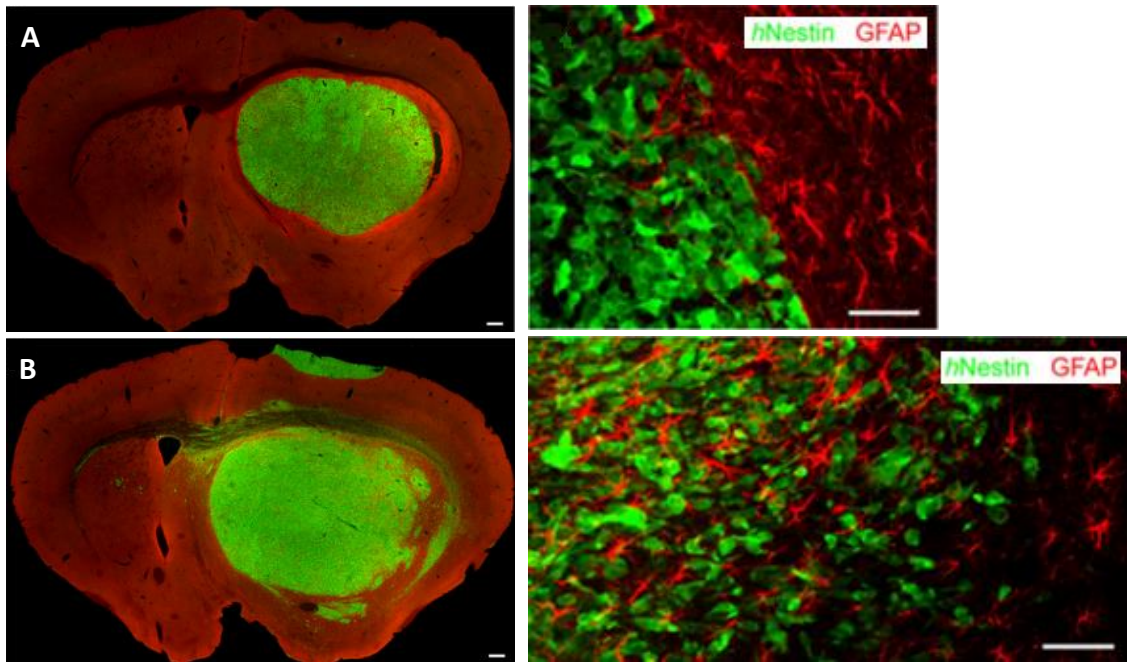
---

<sup>81</sup> Hiraga S, Arita N, Ohnishi T, Izumoto S, Taki T, Yamamoto H, Higuchi M, Hayakawa T. *Transformation of type 1 astrocytes with N-ethyl-N-nitrosourea: establishment of an in vitro system and the role of the p53 gene*. *Glia*. 1995 Jan;13(1):51-63.

<sup>82</sup> Hiraga S, Arita N, Ohnishi T, Izumoto S, Taki T, Higuchi M, Iwaisako K, Sakoda S, Yamamoto Y, Hayakawa T. *Establishment of spontaneously immortalized rat type 1 astroglial cell lines: the role of p53 in astroglial carcinogenesis*. *Glia*. 1996 Nov;18(3):185-99.

<sup>83</sup> Silver DJ, Siebzehnrubl FA, Schildts MJ, Yachnis AT, Smith GM, Smith AA, Scheffler B, Reynolds BA, Silver J, Steindler DA. *Chondroitin sulfate proteoglycans potently inhibit invasion and serve as a central organizer of the brain tumor microenvironment*. *J Neurosci*. 2013 Sep 25;33(39):15603-17.





**Figura 13.** Perfiles invasivos diferenciales en distintos modelos de trasplantes. A- modelo convencional utilizando la línea U-87MG derivada de Glioblastoma. B- Células de GBM primarias humanas que recrean mejor la patología que una línea celular establecida. Adaptada de Silver et al<sup>83</sup>.

En resumen, los modelos de glioma en roedores parecen proporcionar un equilibrio entre un cerebro de tamaño razonable para el estudio *in situ* junto con un mantenimiento de los animales relativamente económico. Los modelos de glioma de roedores han experimentado un refinamiento en los últimos 60 años. Los modelos de nitrosourea tienen la ventaja de producir tumores autóctonos, pero tienden a tener períodos latentes muy largos y variables. El cuidado a largo plazo de los animales y las instalaciones a implementar para trabajar con carcinógenos pueden hacer que estas técnicas sean más caras que los modelos de trasplante. Los modelos de trasplante tienden a ser más previsibles y menos costosos. Las células trasplantadas son el producto del proceso de selección artificial del cultivo celular y de muchos pasajes, además de demandar la inmunosupresión de los animales y de presentar usualmente rasgos histopatológicos que difieren de los gliomas humanos. A la hora de elegir un modelo particular, es importante reconocer sus limitaciones de eficiencia y latencia de la producción de tumores, gasto, respuesta al tratamiento, características histológicas y comportamiento biológico.

En esta línea, se reconoce que si bien estos modelos clásicos tienen ventajas considerables, con el fin de obtener mejores resultados trasladables a la patología humana, es necesario implementar nuevas estrategias que permitan desarrollar modelos más fieles desde el punto de vista histopatológico, interacción tumor-microambiente y que a su vez ofrezcan altas tasas de éxito y reproducibilidad. Dicha problemática es la que será abordada en este trabajo de tesis.



# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



## **HIPOTESIS**

Mediante la utilización del carcinógeno *N*-metil-*N*-nitrosourea es posible generar un modelo de tumorigénesis cerebral en animales inmunocompetentes que recapitule algunos de los rasgos histológicos observados en gliomas humanos de alto grado y que ofrezca ventajas comparativas respecto de otros modelos disponibles.

## **OBJETIVO GENERAL**

En base a modificaciones novedosas de modelos ya existentes e implementando nuevas herramientas generadas en el laboratorio, obtener un nuevo modelo de tumorigénesis cerebral en ratas inmunocompetentes para el estudio de la biología básica de los gliomas, que además sea una potencial herramienta para la investigación diagnóstica y terapéutica.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Implementar diferentes modalidades experimentales que permitan desarrollar un modelo de tumorigénesis que supere las desventajas de los modelos experimentales tradicionales y que tenga además, altas tasas de éxito y reproducibilidad.
2. Con el modelo que presente las mayores ventajas, se iniciará la caracterización de sus rasgos morfológicos y otros aspectos relevantes de la biología de estos tumores.



# ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cumplir con el **objetivo 1** se planteó realizar diferentes modelos animales novedosos de carcinogénesis con el objetivo de generar tumores cerebrales. En base a trabajos previos y modalidades de trabajo ya existentes se plantearon modificaciones y generación de herramientas en el laboratorio se plantean en este trabajo tres opciones novedosas. Las opciones planteadas fueron las siguientes: **A-** un modelo de carcinogénesis química en animales neonatos, en donde se realizan modificaciones a un modelo clásico con el fin de disminuir los costos así como el estrés para el animal y el operador y **B-** un modelo singénico de trasplante celular ectópico, el cual involucra un modo poco usual de administración de células que fueron transformadas con éxito en nuestro laboratorio. En caso de que ninguno de ellos ocasionara tumores cerebrales se planificó realizar un modelo singénico de trasplante celular ortotópico de esas mismas células a pesar de las mayores dificultades experimentales que conlleva (opción **C**). Luego de obtener, el/los modelo/s, se evaluó comparativamente las ventajas y desventajas de cada uno y el objetivo 2 fue realizado en el modelo considerado más adecuado para nuestros propósitos.

### **A- Modelo de carcinogénesis química inducida en neonatos**

Este modelo se basa en el descrito por Druckrey y colaboradores<sup>60</sup> que consiste en la inyección de un nitrosocompuesto en ratas preñadas, induciendo así la aparición de neoplasias en las crías. La exposición de los fetos al agente carcinógeno en un período final de diferenciación de un tejido, en este caso el nervioso, junto al hecho que dicho tejido presenta mecanismos de reparación deficientes para la principal modificación introducida por el MNU (O<sup>6</sup>-metilación de la Guanina), permite que tras una única administración del carcinógeno haya una alta probabilidad de inducción efectiva de neoplasias gliales<sup>60</sup>.

Esta aproximación conlleva una alta variabilidad en la inducción de tumores en los hijos, además de un estrés muy grande tanto para la hembra gestante y su progenie como para el operador, debido a que el modelo original involucra administrar el carcinógeno a una hembra al final de su gestación para exponer a los fetos por vía transplacentaria. Para evitar estos inconvenientes, poder realizar un seguimiento individualizado de los animales inyectados con el carcinógeno y de sus controles hermanos, se pretende inyectar directamente una solución de MNU o vehículo en neonatos P1. En este período la diferenciación de la glía aún no ha finalizado y se observan altas tasas de proliferación glial<sup>84</sup>, lo que implica que el SNC aún está vulnerable a la exposición de un carcinógeno. La inyección se realizará en la *cisterna magna* (o *cisterna cerebellomedullaris*), una de las principales vías de acceso al espacio subaracnoideo, dado a que es fácil de localizar y que posibilita el contacto directo con todo el SNC debido a la perfusión del líquido cefalorraquídeo. Esta aproximación brinda además la posibilidad de reducir la cantidad de MNU usado dado ya que no se administra por vía sistémica en la madre, sino localizado a cada neonato.

---

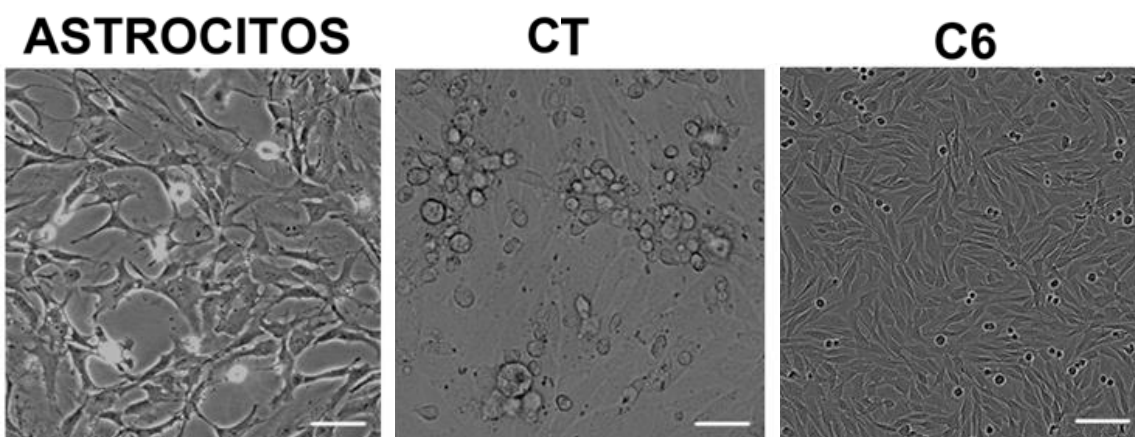
<sup>84</sup> Sloan SA, Barres BA. *Mechanisms of astrocyte development and their contributions to neurodevelopmental disorders*. Curr Opin Neurobiol. 2014 Aug;27:75-81

## B- Modelo singénico de trasplante celular ectópico

Tal como fue explicado antes, los modelos de trasplante ofrecen ventajas sobre los modelos de inducción química, tales como una latencia determinada, alta reproducibilidad y facilidad de implementación en el laboratorio.

Sin embargo, los modelos celulares de trasplante usualmente tienen la desventaja de requerir cierto grado de inmunosupresión lo que significa un retroceso importante en la obtención de resultados trasladables a la clínica. Por lo tanto, con el fin de tener un modelo que sea de relevancia en la investigación terapéutica, se plantea utilizar animales inmunocompetentes utilizando un enfoque de trasplante singénico, induciendo químicamente la transformación de células gliales de un individuo donante y luego transfiriendo dichas células a otro individuo de la misma colonia.

En la línea de los trabajos de Hiraga<sup>81,82</sup>, se ha logrado exitosamente transformar un cultivo primario de glía mixta con una sola dosis de nitrosourea, el cual se visualiza en la **figura 14** bajo el nombre de CT (células transformadas). Las células tras haber sido expuestas al carcinógeno (ver detalles en materiales y métodos) exhiben una tasa de proliferación extremadamente elevada, siendo necesario realizar pasajes periódicamente a un ritmo similar que la línea C6 (**figura 14**, panel derecho) sin observarse signos de deterioro o de envejecimiento del cultivo. En las células transformadas, se distinguió además la pérdida de inhibición por contacto, dado que son capaces de crecer en agregados una vez que no disponen de sustrato para adherirse a diferenciándose los cultivos de los astrocitos (**figura 14**, panel izquierdo), donde todas las células crecen como una monocapa adherida al sustrato.



**Figura 14- Apariencia del cultivo de células transformadas.** Las células transformadas crecen en agregados (centro) adiferenciándose los astrocitos en cultivo (izquierda) y presentan una morfología fibroblastoide similar a las C6 (derecha), aunque son de mayor tamaño. *Barra de calibración: 50µm*

En primera instancia, se planteó hacer trasplantes ectópicos debido a que no requieren intervención quirúrgica. Se plantea inyectar las células en la cisterna magna, esperando que de esa manera puedan alojarse en alguna parte del sistema nervioso.

### **C- Modelo singénico de trasplante celular ortotópico**

Los modelos de trasplante ortotópicos son recomendados, debido a que incorporan las interacciones con el microambiente en donde usualmente se desarrolla el tumor. Asimismo, existen varios reportes que avalan el uso de esta modalidad para obtener resultados más trasladables a la clínica<sup>85,86</sup>.

En este trabajo, se planteó realizar inyecciones estereotáxicas de las células transformadas en nuestro laboratorio con MNU en las adyacencias de la *substantia nigra*, una zona que no compromete la viabilidad inmediata del animal intervenido para tener una ventana temporal previa a la aparición de síntomas graves. Y que permita además la realización de experimentos futuros como la caracterización y evaluación de compuestos con presuntas actividades anti-glioma.

Para estos experimentos, la línea tumoral de rata C6 fue seleccionada como control de los experimentos. Es una línea altamente validada a pesar de que los modelos de glioma por trasplante no suelen ser exitosos, probablemente debido a su alta inmunogenicidad<sup>86</sup>, por lo que se espera *a priori* una respuesta retardada o de baja eficacia en los hospederos.

Los animales pertenecientes a los distintos abordajes y grupos experimentales fueron procesados a distintos tiempos tal como se explica en Materiales y métodos. Una vez procesado el tejido cerebral y de médula, habiendo obtenido cortes finos se utilizó la sonda nuclear Hoechst para hacer un *screening* primario. El Hoechst se intercala en el ADN nuclear lo que constituye una herramienta útil para detectar anomalías histoarquitectónicas y alteraciones nucleares que podrían indicar la presencia de un tumor. Resultados de trabajos anteriores empleando DAPI se muestran en la **figura 15** (adaptada de Wang et al. y Siva et al.<sup>87,88</sup>) Se observa acumulación de núcleos en tejido tumoral respecto a un control de una zona similar (**figura 15A y B**) y anomalías nucleares observadas en gliomas de alto grado. Las flechas señalan núcleos de morfología aberrante que se ven con varios lóbulos.

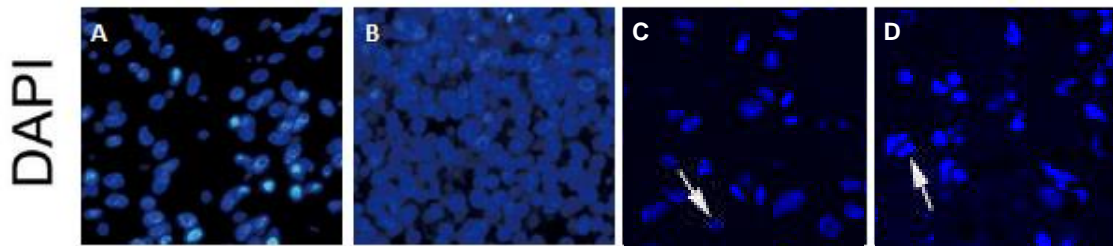
---

<sup>85</sup> Talmadge JE, Singh RK, Fidler IJ, Raz A. *Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer*. Am J Pathol. 2007 Mar;170(3):793-804.

<sup>86</sup> Garrido-Laguna I1, Uson M, Rajeshkumar NV, Tan AC, de Oliveira E, Karikari C, Villaroel MC, Salomon A, Taylor G, Sharma R, Hruban RH, Maitra A, Laheru D, Rubio-Viqueira B, Jimeno A, Hidalgo M. *Tumor engraftment in nude mice and enrichment in stroma-related gene pathways predict poor survival and resistance to gemcitabine in patients with pancreatic cancer*. Clin Cancer Res. 2011 Sep 1;17(17):5793-800.

<sup>87</sup> Wang X, Zhang H, Zhang A, Han L, Wang K, Liu R, Yang S, Pu P, Shen C, Kang C, Yu C. *Upregulation of miR-20a and miR-106b is involved in the acquisition of malignancy of pediatric brainstem gliomas*. Oncol Rep. 2012; 28(4):1293-300.

<sup>88</sup> Siva K, Venu P, Mahadevan A, S K S, Inamdar MS. *Human BCAS3 expression in embryonic stem cells and vascular precursors suggests a role in human embryogenesis and tumor angiogenesis*. PLoS One. 2007; 2(11):e1202.



**Figura 15.** Ejemplos de anomalías visualizadas por DAPI en muestras de tejido extraídas de glioma comparado con regiones equivalentes en animales sanos de la misma edad. A es tejido de tallo cerebral normal. En B se ve el aumento de la cantidad de núcleos que se ve en el tallo cerebral de un paciente con glioma. En C y D se observan muestras de un GBM, en flechas se señalan núcleos pleomórficos y mitosis evidenciadas por la tinción con DAPI.

La tinción de Nissl fue empleada para identificar las zonas con mayor densidad de células en base a los resultados preliminares propios y a los datos reportados por Wirth y colaboradores<sup>89</sup>, que indican una captación mayor de las células tumorales.

Para realizar el **objetivo 2** relativo inicio de la caracterización de los tumores cerebrales inducidos se plantearon una serie de abordajes tendientes a lograr elementos que aporten a su clasificación.

El concepto de clasificación de los tumores del SNC se remonta a 1926 y fue introducido por Bailey y Cushing<sup>90</sup> en la elaboración de lo que resultó ser la primera clasificación sistemática de los gliomas. Desde entonces se introdujeron varios cambios a los criterios considerados y paulatinamente surgen más subcategorías asociadas a distintos tipos de tumores con distintas indicaciones y pronósticos.

Tal como fue mencionado anteriormente, la clasificación acordada por la OMS es la más utilizada en la clínica y abarca criterios relacionados a la evolución y pronóstico de los tumores, aspectos histológicos, celulares y moleculares<sup>17</sup>. Desde el punto de vista histológico, el sistema de la OMS se basa en los criterios del sistema de St Anne-Mayo<sup>91</sup> que utiliza criterios morfológicos (atipias nucleares, mitosis, proliferación endotelial (no hipervascularidad) y necrosis) para asignar grado a los astrocitomas. Los abordajes empleados tuvieron esos criterios en cuenta juntoa otros aspectos relevantes en la biología del tumor, como su carácter infiltrante (típico de los gliomas y usualmente ausente en los modelos clásicos de trasplante) y la expresión de marcadores de células madres o progenitores que han sido relacionados con la agresividad y el pronóstico de los gliomas.

<sup>89</sup> Wirth D, Snuderl M, Curry W, Yaroslavsky A. *Comparative evaluation of methylene blue and demeclocycline for enhancing optical contrast of gliomas in optical images.* J Biomed Opt. 2014 Sep;19(9):90504.

<sup>90</sup> Bailey P, Cushing H. *A classification of the tumors of the glioma group on a histogenic basis with a correlated study of prognosis.* J B Lippincott Co. Philadelphia. 1926.

<sup>91</sup> Buckner JC, Brown PD, O'Neill BP, Meyer FB, Wetmore CJ, Uhm JH. *Central nervous system tumors.* Mayo Clin Proc. 2007 Oct;82(10):1271-86.



### **Determinación del carácter infiltrante**

La infiltración difusa de las células tumorales en el tejido cerebral es un rasgo central de los astrocitomas de alto grado y algunas formas de tumores de grado 2<sup>17</sup>. Esto implica que las células tengan capacidad de migrar desde la masa tumoral primaria en forma imperceptible, dificultando la remoción quirúrgica y la respuesta al tratamiento de los pacientes. En contraste, algunas formas de tumores de bajo grado tienden a expandirse, pero de forma discreta, generando lesiones no invasivas. La infiltración difusa característica de gliomas agresivos suele no poder recrearse en los modelos de trasplante clásicos<sup>79</sup>.

Se espera que la tinción de Nissl permita distinguir los tumores inducidos del resto del tejido nervioso, permitiendo identificar la forma de los bordes y los posibles grupos de células que se escapen de la masa tumoral primaria. A su vez, el empleo de marcadores astrocitarios típicos como GFAP y S100β<sup>92</sup> permite analizar la interacción entre el tumor y el tejido desplazado del hospedero, ya que según el carácter infiltrante o no infiltrante del neoplasma se observan distintos perfiles en la disposición de los astrocitos<sup>83</sup>.

### **Observación de atipias nucleares**

La atipia nuclear es un concepto utilizado en histopatología y fisiopatología que hace referencia a la apariencia anormal de los núcleos celulares, ya sea por alteraciones en la forma, tamaño o aspecto de dicho organelo<sup>18</sup>. Es uno de los aspectos que diferencia un astrocitoma infiltrante de una proliferación glial reactiva (gliosis) que también presenta hiper celularidad<sup>17</sup>. En lo referente a tumores de cerebro, la atipia nuclear aumenta con el grado de malignidad, usualmente observándose en tumores de grado II y aumentando en severidad a medida que la lesión es de grado mayor. El empleo de Hoescht que se intercala en el ADN en forma estable, fue empleado para analizar la morfología nuclear de los tumores inducidos.

### **Reconocimiento de perfiles vasculares**

La proliferación de células del endotelio vascular es un rasgo común entre los cánceres agresivos y usualmente está asociada a un pronóstico poco alentador<sup>93</sup>. Típicamente esta proliferación aberrante se evidencia con la aparición de los vasos glomeruloides que se forman por el empaquetamiento de células endoteliales que se dividen activamente y no alcanzan a organizarse de manera correcta. Los vasos glomeruloides están asociados con los gliomas de más alto grado<sup>93</sup>.

Se emplearon dos marcadores (colágeno IV y lectina de tomate) para visualizarlos vasos sanguíneos. El colágeno IV está presente en las membranas basales extracelulares que separan una variedad de células epiteliales y endoteliales y tienen importantes efectos estructurales y funcionales en los vasos sanguíneos. Estudios de microscopía confocal revelan que la membrana basal identificada por inmunoreactividad de

---

<sup>92</sup> Sofroniew MV, Vinters HV. *Astrocytes: biology and pathology*. Acta Neuropathol. 2010 Jan;119(1):7-35.

<sup>93</sup> Jain RK, di Tomaso E, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG, Batchelor TT. *Angiogenesis in brain tumours*. Nat Rev Neurosci. 2007 Aug;8(8):610-22.

colágeno tipo IV cubre más del 99,9% de la superficie de los vasos sanguíneos identificados en la piel<sup>94</sup>, por lo que este marcador se considera excelente para evidenciar la presencia de vasos y para analizar su morfología.

Varias lectinas se unen a glucoconjugados presentes en la membrana de las células endoteliales. La lectina de tomate específicamente se une a los residuos de poli-*N*-acetilactosamina de carbohidratos complejos presentes en las células endoteliales y en la microglía, por lo que ha sido usada con éxito para la visualización de estructuras vasculares<sup>95</sup>.

### **Expresión de marcadores de célula madre tumoral**

Los tumores cerebrales humanos se caracterizan por ser extremadamente heterogéneos, constituyendo un nicho donde pueden coexistir muchas poblaciones celulares diferentes respecto a sus capacidades proliferativas y estado de diferenciación<sup>96</sup>. Algunas de esas células tienen capacidades de autorenovación y un estado de diferenciación inferior, además de una capacidad proliferativa diferente, lo que concede a los tumores la capacidad de regenerarse y de evadir a las terapias convencionales.

El marcador CD133, que corresponde a una glucoproteína de función desconocida, es comúnmente utilizado como marcador de célula madre tumoral (CSC)<sup>97</sup>. Otro marcador interesante es la nestina. Un citoesqueleto con abundante nestina como filamento intermedio se expresa en muchos tipos de células durante el desarrollo pero su expresión es generalmente transitoria y no persiste en la edad adulta. Por lo tanto, su expresión en un tumor indica la presencia de células poco diferenciadas. Cabe destacar que a través del trabajo con muestras de tejido humano, se ha logrado correlacionar tanto la expresión de nestina como la de CD133 con un comportamiento más agresivo del tumor y con una gradación mayor según la escala de la OMS<sup>98</sup>. Se evaluará también la expresión de Olig2, que corresponde a un factor de transcripción cuya expresión está asociada a subconjuntos de células madre y progenitoras en el cerebro normal, gliomas difusos de grado II / III y subpoblaciones similares a progenitoras de múltiples subclases de glioblastoma<sup>99</sup>.

---

<sup>94</sup> Abreu-Velez AM, Howard MS. *Collagen IV in Normal Skin and in Pathological Processes*. N Am J Med Sci. 2012 Jan; 4(1): 1–8.

<sup>95</sup> Robertson RT, Levine ST, Haynes SM, Gutierrez P, Baratta JL, Tan Z, Longmuir KJ. *Use of labeled tomato lectin for imaging vasculature structures*. Histochem Cell Biol. 2015 Feb;143(2):225-34

<sup>96</sup> Huse JT, Holland EC. *Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma*. Nat Rev Cancer. 2010 May;10(5):319-31.

<sup>97</sup> Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. *Neural stem cells and the origin of gliomas*. N Engl J Med. 2005 Aug 25;353(8):811-22.

<sup>98</sup> Zhang M1, Song T, Yang L, Chen R, Wu L, Yang Z, Fang J. *Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients*. J Exp Clin Cancer Res. 2008 Dec 24;27:85

<sup>99</sup> Ligon KL, Huillard E, Mehta S, Kesari S, Liu H, Alberta JA, Bachoo RM, Kane M, Louis DN, Depinho RA, Anderson DJ, Stiles CD, Rowitch DH. *Olig2-regulated lineage-restricted pathway controls replication competence in neural stem cells and malignant glioma*. Neuron. 2007 Feb 15;53(4):503-17.



# MATERIALES Y MÉTODOS



## MATERIALES

Los medios de cultivo, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM); la tripsina y los antibióticos, fueron comprados a GIBCO® (Invitrogen). El suero fetal bovino (FBS) fue comprado a PAA. El material plástico, botellas y placas de Petri fueron comprados a Corning y Greiner Bio-One. Otros reactivos como la albúmina sérica bovina (BSA), lectina de tomate, ADNasa, paraformaldehído, ácidos, bases, sales, detergentes y demás reactivos fueron comprados a Sigma y Gibco. Los anticuerpos primarios fueron comprados a abcam, Sigma, invitrogen y los anticuerpos secundarios a invitrogen. El kit ABC fue comprado a Vector.

## MÉTODOS

### Cultivo y transformación de células gliales

En primer lugar se realizó un cultivo primario de astrocitos corticales a partir de células disgregadas de la corteza cerebral de un animal recién sacrificado. El protocolo empleado fue el reportado por Saneto y De Vellis con modificaciones menores<sup>100,101</sup>.

Brevemente, 3 ratas neonatas de la cepa Sprague Dawley fueron sanitizadas por inmersión del cuerpo en etanol 70% y luego decapitadas en forma indolora bajo campana de flujo laminar. Se retiró el cráneo, expuso el cerebro y se disecaron las hemicortezas de cada rata. Bajo inmersión del tejido en solución salina tamponada estándar (PBS), se retiraron las meninges y el tejido limpio fue cortado en trozos pequeños con bisturí. Luego se realizó una digestión enzimática empleando tripsina 0,05%-EDTA durante 25 min a 37°C. El EDTA quela el calcio y favorece la desestabilización de las uniones intercelulares y las uniones célula-matriz, favoreciendo la degradación de las proteínas de adhesión por la tripsina. La acción de la tripsina se detuvo agregando DMEM-HEPES conteniendo 10 % v/v suero fetal bovino (SFB). Luego se adicionó ADNasa 1mg/ml a una concentración final de 50 µg/mL para disminuir la formación de agregados celulares durante el proceso de disgregación al romper el ADN libre proveniente de las células lisadas. La digestión química fue seguida de una disgregación mecánica mediante pipeteo repetido sin generación de burbujas de aire. La suspensión obtenida luego de la digestión química y mecánica fue pasada a través de una malla de 80 µm para eliminar detritos celulares grandes y luego se centrifugó durante 10 min a 1000 rpm (Sigma CL-2). El *pellet* obtenido fue resuspendido en medio de cultivo (DMEM-HEPES suplementado con 10% v/v SFB, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina,) a una densidad de 400.000 cel/mL y

---

<sup>100</sup>De Vellis J, Wu DK and Kumar S: *Enzyme induction and regulation of protein synthesis. In: Astrocytes: Biochemistry, Physiology, and Pharmacology of Astrocytes. Vol.2.* (Fedoroff S and Vernadakis A, eds). Academic Press, INC; Orlando, Florida, 1986, pp 209-237.

<sup>101</sup>Cassina P, Peluffo H, Pehar M, et al. *Peroxynitrite Triggers a Phenotypic Transformation in Spinal Cord Astrocytes That Induces Motor Neuron Apoptosis.* J Neurosci Res., 2002, 67:21–29.

posteriormente transferido a una botella de cultivo. Tras 72 h de incubación en estufa a 37°C y a 95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>, el medio de cultivo fue reemplazado totalmente y luego cambiado día por medio hasta confluencia. Las células fueron expuestas a MNU (20 µg/mL) desde el primer cambio de medio hasta confluencia siguiendo el protocolo descrito por Lazzaro y colegas con pequeñas modificaciones<sup>102</sup>. Luego de ese tiempo se procedió al retiro del agente metilante, se cambió el medio de cultivo y se procedió a realizar pasajes sucesivos de las células transformadas.

### **Criopreservación**

Para la conservación de las células se utilizó una mezcla crioprotectora compuesta por 10% DMSO y 90% SFB. El DMSO actúa como agente criopreservante ya que es permeable a las membranas celulares y puede desplazar parte del agua del interior de la célula evitando así la formación de cristales de hielo intracelulares que pueden dañar estructuras durante el congelamiento y luego en el descongelamiento provocando incluso su destrucción y la muerte celular<sup>103</sup>. Para proceder a la criopreservación, las células fueron expuestas a tripsina-EDTA 0.05% durante 7 min en estufa a 37°C y 95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>. La tripsinización se detuvo, se centrifugó a 200 g durante 5 min, se descartó el sobrenadante y se realizó el conteo de las células en cámara de Neubauer. El *pellet* celular se resuspendió en el volumen necesario de mezcla crioprotectora para obtener una concentración entre 2 y 3x10<sup>6</sup> cel/mL. El volumen total de la suspensión celular se distribuyó en alícuotas de 1 mL en criotubo. Los tubos fueron colocados en una cámara de enfriamiento (Mr. Frosty™ Freezing Container) que contiene isopropanol. La cámara de enfriamiento se depositó en un freezer de -80°C para realizar un enfriamiento progresivo de 1°C/min que asegura una velocidad óptima para la preservación celular ya que minimiza la formación de cristales intracelulares. Luego de 4 h de enfriamiento, los criotubos se retiraron del Mr. Frosty y se almacenaron en nitrógeno líquido.

### **Descongelado y revitalización**

Para el descongelado y revitalización de las células, se colocó el criotubo conteniendo las células congeladas en un baño de agua a 37°C durante no más de 1 min. Las células descongeladas se transfirieron a un tubo cónico con 10 mL de medio de cultivo a 37°C y se centrifugaron a 200 g durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* celular se resuspendió en 1 mL de medio de cultivo. Luego se realizó el recuento celular con el objeto de evaluar cantidad y viabilidad de las células recuperadas. Los *batches* de células que presentaron más del 95% de viabilidad fueron sembrados en botellas de cultivo de 25cm<sup>2</sup> hasta su uso final. El cambio de medio se realizó día por medio.

---

<sup>102</sup>Lazzaro G, Mehta R, Shilkaitis A, Dasgupta T. *Transformation of human breast epithelial cells by 7, 12, dimethylbenz(a)anthracene, but not by N-methyl-N-nitrosourea, is accompanied by up-regulation of basic fibroblast growth factor.* Oncol Rep. 1997 Nov-Dec;4(6):1175-80

<sup>103</sup>Pegg D. *Principles of cryopreservation.* Methods Mol Biol. 2007;368:39-57.

## Mantenimiento de las células

Todas las células empleadas en esta tesis fueron crecidas en adherencia en botellas de 25 o de 75 cm<sup>2</sup> realizando pasajes sucesivos mediante tripsinización (0.05% tripsina-EDTA, 7 min, 37°C, 95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>) cada vez que alcanzaron la confluencia y por un máximo de 10 pasajes.

## Recuento y evaluación de viabilidad celular

El recuento celular se realizó en cámara de Neubauer de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Brevemente, se diluyeron 5 µL de la dilución celular a contar en 95 µL de PBS y se sembraron en los dos compartimientos de la cámara de Neubauer. Se contaron las células presentes en 5 campos de cada compartimiento, se realizó el promedio numérico y se corrigió por la dilución y el volumen.

La concentración de células viables se determinó empleando el método de exclusión con Azul de Tripán en el cual el colorante se incorpora en las células muertas debido a la alteración de la integridad de la membrana plasmática. Las muestras obtenidas de los cultivos fueron incubadas con una solución de Azul de Tripán 0,5% en PBS durante 3 min e inmediatamente se sembraron en la cámara<sup>104</sup>. Se contaron las células teñidas y las células incoloras de 5 campos de cada compartimiento, se realizó el promedio y se determinó la tasa de viabilidad como el porcentaje de células incoloras respecto de las células totales (incoloras y azules).

## ANIMALES

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley de la cepa del IIBCE. Los animales adultos empleados (4 meses) fueron mantenidos con alimento y agua *ad libitum* en un régimen de temperatura y humedad controlada y un ciclo de luz oscuridad de 12 h. Para todos los procedimientos experimentales, los animales fueron anestesiados por vía intraperitoneal con Ketamina/Xilacina (90:10 mg/kg), una combinación de un anestésico disociativo con un sedante que es suficiente para producir un nivel de anestesia profunda<sup>105</sup>. Luego del procedimiento experimental realizado los animales fueron mantenidos en condiciones estables en jaulas de observación hasta la desaparición de los efectos de la anestesia. En caso de abordajes donde se emplearon neonatos, se utilizaron 3 nacimientos totales. Luego de los abordajes experimentales, las crías permanecieron con la madre hasta el fin del experimento o hasta el destete. Todos los procedimientos utilizados fueron previamente publicados y aprobados por el comité de ética del IIBCE y bajo la ley de experimentación animal No 18.611.

---

<sup>104</sup> Strober W. *Trypan blue exclusion test of cell viability*. Curr. Protocol. Immunol. 1997, 21: A.3.B.1-A.3.B2.

<sup>105</sup> Van Pelt LF. *Ketamine and xylazine for surgical anesthesia in rats*. J Am Vet Med Assoc. 1977 Nov 1;171(9):842-4.

## ABORDAJES TENDIENTES A LA PRODUCCIÓN DE TUMORES INTRACEREBRALES

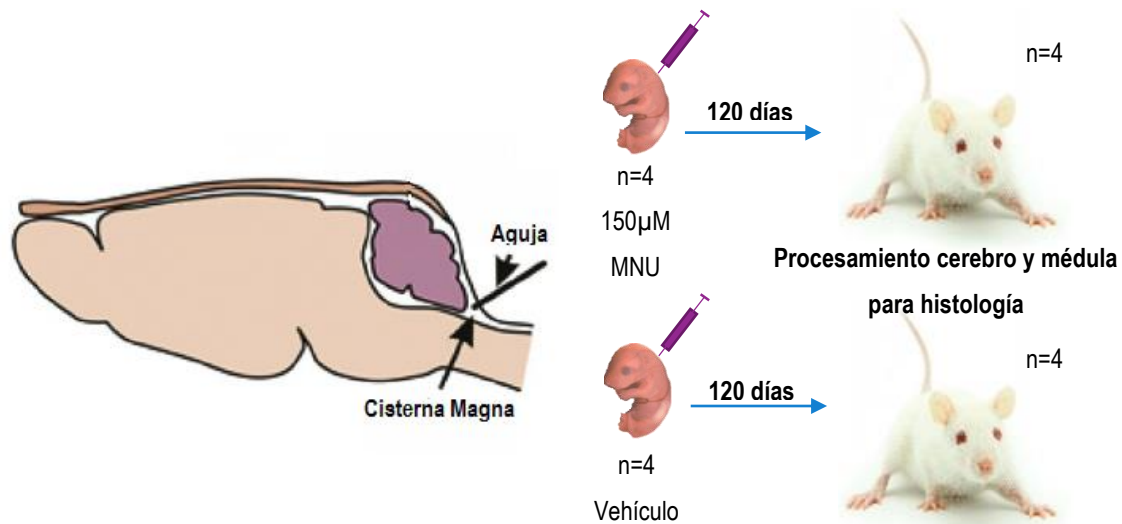
### Modalidad A: Administración de MNU en la cisterna magna de neonatos

Se utilizaron neonatos (P1) provenientes de una misma camada, en tres tandas experimentales diferentes. En cada experimento, se seleccionaron 4 animales preferentemente machos y de pesos comparables. Se delimitó la zona de la Cisterna magna IV ventrículo y se administraron 3-5  $\mu\text{L}$  de una solución de MNU 2mM (200  $\mu\text{g/g}$ ) para obtener una dosis final de 0,2  $\mu\text{g/g}$  de peso de animal. Otros 4 animales de la misma camada fueron tomados como control y fueron inyectados con 5  $\mu\text{L}$  de vehículo (PBS). Se pretendió minimizar la variabilidad genética en el proceso de desarrollo del tumor utilizando animales hermanos de padre y madre provenientes de la misma camada. El esquema de trabajo se muestra en la **figura 16**.

Para la inyección en la cisterna magna se emplearon protocolos previamente validados y empleados en el laboratorio desde un tiempo considerable<sup>106</sup>. La cabeza del animal se sanitizó con etanol 70%. Luego un ayudante flexionó la cabeza del animal para exponer la región a ser inyectada. El experimentador introdujo manualmente una aguja 31G X 2" (de uso odontológico) en una trayectoria de 45°, perforando piel y músculo, hasta atravesar la membrana atlanto-occipital. La aguja fue modificada para que tuviera un tope a los 2mm del bisel para evitar dañar estructuras importantes que puedan condicionar la sobrevivencia de los neonatos. Una vez que la aguja fue posicionada correctamente, se suministró la solución de carcinógeno o de vehículo según el grupo experimental. Los animales de ambos grupos fueron procesados 120 días después de la administración del carcinógeno o vehículo, atendiendo a los tiempos reportados para el desarrollo de tumores inducidos por el compuesto<sup>60</sup>, disecándose cerebro y médula espinal para posterior análisis.

---

<sup>106</sup> Olivera S, Fernandez A, Latini A, Rosillo JC, Casanova G, Wajner M, Cassina P, Barbeito L. Astrocytic proliferation and mitochondrial dysfunction induced by accumulated glutaric acidemia I (GAI) metabolites: possible implications for GAI pathogenesis. *Neurobiol Dis.* 2008 Dec;32(3):528-34.



**Figura 16.** A la izquierda, esquema del lugar de inyección (En P1 el desarrollo del cerebelo aún no ha concluido lo que permite distinguir esa región a simple vista). A la derecha, esquema de trabajo con animales.

### **Modalidad B: Administración de células transformadas en la cisterna magna**

En dos tandas experimentales diferentes, se inyectaron 6 ratas SD de 3-4 meses con una suspensión de 200.000 células transformadas y 6 ratas de la misma edad con igual volumen de vehículo (PBS). La inyección se realizó en forma manual en la cisterna magna luego de anestesiarse profundamente a los animales con Ketamina:Xilacina (90:10 mg/kg). Los procedimientos son similares a los reportados previamente<sup>104</sup>. Los animales fueron procesados a los 90 días postinyección.

### **Modalidad C: Administración intracerebral de células transformadas mediante estereotaxia**

La cirugía estereotáxica es una intervención mínimamente invasiva que emplea un sistema de coordenadas tridimensional y de un buen punto de referencia para localizar estructuras dentro del cuerpo y realizar posteriormente acciones entre las que se incluyen la extirpación de cuerpos pequeños como micropólipos, cauterización de lesiones, biopsia, lesión, inyección, estimulación o implantación de dispositivos entre otros. Esta técnica se emplea exitosamente en el SNC, dado que en el cerebro es fácil ubicar estructuras teniendo como referencia puntos anatómicos en el cráneo<sup>68</sup>. Por ejemplo, los atlas cerebrales utilizan como puntos de referencia el conducto auditivo externo, las crestas de la órbita inferior, el punto medio del maxilar entre los incisivos o el bregma (punto en donde la sutura coronal se intersecta perpendicularmente con la sutura sagital) (**figura 17B**).

Se realizaron 4 tandas de experimentos independientes con 5 animales inyectados con células transformadas y 5 animales con vehículo. Se realizaron 2 experimentos independientes además inyectando

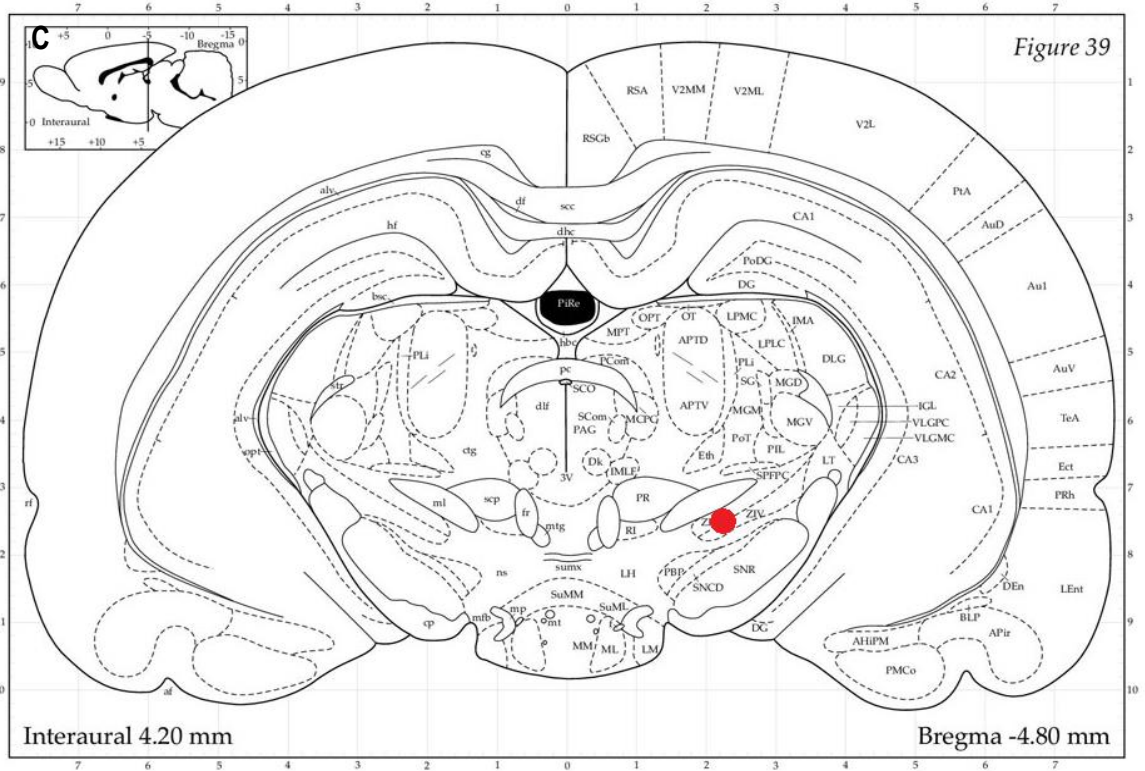
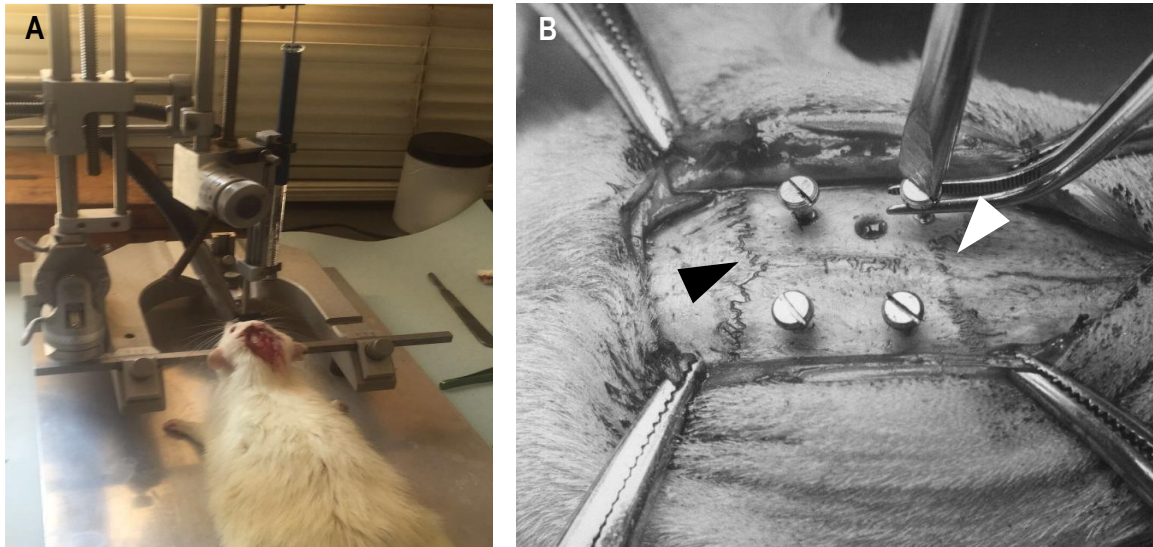


cada vez 4 animales con células C6 y 4 animales con vehículo. En todos los experimentos se emplearon ratas SD de entre 3 y 4 meses de edad y de peso no mayor a 400 g.

Para proceder a la administración de las células mediante estereotaxia se pesaron las ratas y se calculó la dosis necesaria de Ketamina y Xilacina para una anestesia profunda. Una vez anestesiados, los animales fueron fijados en el aparato estereotáxico con puntos de sujeción en las orejas y en la boca para mantener la cabeza y el cráneo en la orientación adecuada. El estereotáxico tiene además un soporte para la aguja de inyección que puede desplazarse mediante un mecanismo calibrado que permite el movimiento en los tres ejes espaciales (anterior-posterior, dorsal-ventral y lateral-medial) para ubicarla de acuerdo a las coordenadas del lugar de inyección, **figura 17A**). Una vez fijada la cabeza del animal, se cortó la piel y se expuso el cráneo de modo tal que la punta de la aguja quedó situada sobre el bregma. La localización de este punto es medida para cada uno de los ejes para poder mover la aguja a lo largo de la distancia adecuada en el eje antero-posterior y el eje lateral-medial hasta situarla en un punto exactamente por encima del objetivo a inyectar. Para los experimentos de inyección en animales adultos, las coordenadas fijadas (obtenidas de un atlas estereotáxico clásico como referencia<sup>107</sup>) fueron 5,0 mm caudal y 2,2 mm lateral a bregma y 7,2 mm debajo de la superficie del cerebro. Anatómicamente, esta región corresponde a las adyacencias de la *substancia nigra* como se visualiza claramente en la **figura 17C**. Se realizó un agujero en el cráneo utilizando un torno dental que permitió bajar la aguja hasta la altura deseada. Una vez posicionados en el sitio de inyección, se administraron 200.000 células en un volumen de 2  $\mu$ L. Luego de 4 min de espera para permitir la difusión del volumen inyectado, la aguja se retiró lentamente y se procedió a suturar la herida. El animal fue retirado del estereotáxico y se permitió recuperarse de la anestesia. Luego que la sedación fue disminuyendo, los animales fueron devueltos a sus cajas para un monitoreo diario hasta su procesamiento.

---

<sup>107</sup> Paxinos G & Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, 7ª Edición. 2013.



**Figura 17.** Inyección estereotáxica. A- Sujeción de la cabeza del animal realizada bajo anestesia profunda para inyección estereotáxica posterior. B- La cabeza de flecha señala el Bregma, en la intersección de la sutura sagital y coronal. Más atrás se distingue otro punto de referencia, Lambda (flecha negra). C- Lugar de la inyección según las coordenadas fijadas. Adaptado de Paxinos<sup>105</sup>

## Procesamiento de los animales

A los días determinados para cada tipo de tratamiento, los animales inyectados fueron anestesiados con Ketamina:Xilacina en las dosis establecidas previamente (ver **tabla 2**). Luego fueron fijados mediante perfusión intracardiaca con paraformaldehído (PAF) al 4% en PBS 10 mM, pH 7,4. Esta modalidad provoca que el fijador sea introducido a través del sistema circulatorio por el cual puede acceder a los distintos tejidos gracias a la red de capilares. El PAF es un fijador por entrecruzamiento, es decir que actúa mediante la formación de puentes entre las moléculas tisulares por lo que necesita un tiempo razonable para poder actuar<sup>108,109</sup>.

**Tabla 2.** Resumen de los animales utilizados en todos los abordajes experimentales, se detalla el número de animales inyectados con MNU o células. Para cada tanda se utilizaron la misma cantidad de animales control.

Abordaje	Cantidad de animales	Tandas	Edades de sacrificio (PI)
Modalidad A (MNU icv)	4	3	45 días
Modalidad B (CT icv)	6	2	30-40 días
Modalidad C (CT ic)	5	4	14, 21, 28, 35 y 42 días
Modalidad C (C6 ic)	4	2	30-40 días

Para realizar la fijación por perfusión, se colocó el animal anestesiado bajo campana de extracción y se procedió a hacer una incisión abdominal por debajo del reborde costal, el diafragma fue seccionado y el costillar cortado por ambos lados para retirar parte del mismo. Se expuso el corazón, se cortó la aurícula derecha y se pinchó el ventrículo izquierdo con una aguja estéril para circular los líquidos a perfundir empleando el circuito mayor para fijar los órganos. En primer lugar se procedió al lavado del árbol vascular perfundiendo con un volumen de PBS 10 mM, pH 7,4 conteniendo citrato de sodio al 0,4% para minimizar la formación de coágulos que impidan la circulación hacia una zona de tejido. Luego se administró 1 volumen de PAF 4% en PBS. Una vez fijados los animales, se disecaron los cerebros y la médula espinal y se mantuvieron en PAF 4% a 4°C durante 24 h para terminar la fijación por inmersión para proporcionar el tiempo requerido para que el PAF entrecruce suficientes residuos aldehídicos que permitan una buena fijación<sup>108</sup>. Luego de 24 h de inmersión a 4°C, se retiró el PAF 4%, y se sustituyó por PBS- Azida 0,05% para minimizar la contaminación fúngica. El material fijado se mantuvo a 4°C hasta su procesamiento.

<sup>108</sup> Fox CH, Johnson FB, Whiting J, Roller PP. *Formaldehyde fixation*. J Histochem Cytochem. 1985 Aug;33(8):845-53.

<sup>109</sup> Baker JR. *Fixation in cytochemistry and electron-microscopy*. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society Volume 6, Issue 5, September 1958, Pages 303-308

## **Obtención de cortes sagitales y coronales de cerebro y médula.**

El vibratomo es un aparato con el que se obtienen secciones de un grosor que puede oscilar entre las 20-50  $\mu\text{m}$  hasta varios centenares de  $\mu\text{m}$  partiendo de una muestra fijada. La cuchilla del vibrátomo, además de avanzar sobre la muestra, posee un movimiento de vibración lateral a modo de sierra que facilita el corte y evita arrastrar el tejido<sup>110</sup>.

Los cortes de cerebro o médula se realizaron con un vibrátomo Leica 1000 S. Los cerebros a ser seccionados se adhirieron a la platina del vibrátomo con un adhesivo instantáneo de acuerdo a la orientación de los cortes a analizar. Luego de fijar la pieza, se llenó el cubículo con PBS 10 mM, pH 7,4 frío y se seteó el equipo para realizar cortes seriados de 30 o 50  $\mu\text{m}$  a una velocidad de 6,0 mm/s y una frecuencia de 6,0 Hz. Los cortes se recogieron en flotación en PBS-Azida de sodio 0,05 % y se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento. Para realizar cortes a vibrátomo de médula espinal, previamente se encastraron secciones a nivel cervical y lumbar con gelatina-albúmina<sup>111</sup>.

## **Tinción de Nissl con Azul de Metileno**

La tinción de Nissl es empleada comúnmente en secciones de tejido nervioso<sup>112</sup>. Esta técnica permite observar formaciones intraneuronales fuertemente teñidas que se denominan cuerpos de Nissl y se corresponden con acúmulos de retículo endoplasmático rugoso. Este organelo se tiñe con colorantes básicos puesto que contiene una gran concentración de ribosomas y por tanto de ARNr y ARNm en proceso de traducción. Aunque la visualización de los cuerpos de Nissl en tejido nervioso es la principal aplicación de la técnica, ésta puede aplicarse para teñir ácido nucleico en cualquier tejido. En cáncer, debido a la gran celularidad presente, la utilización de esta técnica suele dar un buen contraste entre las células tumorales y las del tejido hospedador<sup>89</sup>.

Para realizar la tinción de Nissl, los cortes fueron pegados sobre portaobjetos recubiertos con 0,2% de gelatina y permanecieron secándose durante una noche a temperatura ambiente para favorecer la adherencia del tejido. Al día siguiente, los cortes se enjuagaron con agua destilada y se expusieron bajo lupa a una solución de azul de metileno al 1% durante aproximadamente 1 min. Luego de ese tiempo, los cortes se lavaron con agua destilada y se procedió a la deshidratación mediante exposición sucesiva a concentraciones crecientes de etanol (70, 90, 95, 100%) durante 5 min cada vez para cortes de 30  $\mu\text{m}$  y 7 min para cortes de 50  $\mu\text{m}$ . La deshidratación culminó con la exposición de cada corte durante 10 min a xilol

---

<sup>110</sup> Zelander T, Kirkeby S. *Vibratome sections of difficult tissues*. Stain Technol. 1978 Sep;53(5):251-5.

<sup>111</sup> Díaz-Amarilla P, Olivera-Bravo S, Trias E, Cragolini A, Martínez-Palma L, Cassina P, Beckman J, Barbeito L. *Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Nov 1;108(44):18126-31.

<sup>112</sup> Einarson L. A Method for Progressive Selective Staining of Nissl and Nuclear Substance in Nerve Cells. Am J Pathol. 1932 May;8(3):295-308.5.

anhidro. Luego los cortes se montados con DPX y se visualizaron por microscopía de luz en un microscopio invertido Olympus IX81.

## Inmunohistoquímica

La técnica de inmunohistoquímica se emplea en la localización de moléculas en los tejidos mediante el empleo de anticuerpos que presentan gran especificidad y alta afinidad para reconocer dichas moléculas y unirse a ellas. Además, la conjugación o combinación de los anticuerpos con enzimas o con sustancias fluorescentes permite detectar cantidades ínfimas de moléculas presentes en el tejido<sup>113,114</sup>.

Es una técnica que gracias a la oferta comercial de anticuerpos y a la estandarización de su protocolo se ha convertido en un método sencillo, rápido y muy potente<sup>115,116,117</sup>.

Los ensayos de inmunohistoquímica se realizaron por flotación en cortes de cerebro o médula espinal de 30 o 50  $\mu\text{m}$  realizados a vibrátomo. Como primer paso los cortes fueron lavados con PBS y permeabilizados con Tritón X-100 (0,1-0,3% en PBS 10 mM, pH 7,4 durante 20 min, a temperatura ambiente). Posteriormente, se incubaron con BSA 5% en PBS durante 1 h, para bloquear los sitios de unión inespecíficos. Luego se realizó la incubación con el o los anticuerpo/s primario/s a 4°C en PBS:BSA 5% durante toda la noche a 4°C y en cámara húmeda (**tabla 3**). Luego de la incubación con el/los anticuerpo/s primario/s, los cortes se lavaron 3 veces durante 5 min con PBS 10 mM, pH 7,4 y se incubaron con el/los anticuerpo/s secundario/s correspondiente/s (**tabla 4**) durante 90 min a temperatura ambiente. Luego de finalizada dicha incubación los cortes se lavaron nuevamente y se montaron con glicerol-PBS (1:1) conteniendo Hoechst 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Los cortes montados se visualizaron en un microscopio confocal Olympus FLUOVIEW FV300, provisto de láseres de 405, 488, 546 y 633 nm. Se realizaron controles negativos, omitiendo los anticuerpos primarios o secundarios.

---

<sup>113</sup> Coons AH, Kaplan MH. *Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody*. J Exp Med. 1950 Jan 1;91(1):1-13.

<sup>114</sup> Coons AH. *Fluorescent antibodies as histochemical tools*. Fed Proc. 1951 Jun;10(2):558-9.

<sup>115</sup> Olivera-Bravo S, Ribeiro CA, Isasi E, Trías E, Leipnitz G, Díaz-Amarilla P, Woontner M, Beck C, Goodman SI, Souza D, Wajner M, Barbeito L. *Striatal neuronal death mediated by astrocytes from the Gcdh<sup>-/-</sup> mouse model of glutaric acidemia type I*. Hum Mol Genet. 2015 Aug 15;24(16):4504-15.

<sup>116</sup> Isasi E, Barbeito L, Olivera-Bravo S. *Increased blood-brain barrier permeability and alterations in perivascular astrocytes and pericytes induced by intracisternal glutaric acid*. Fluids Barriers CNS. 2014 Jul 24;11:15.

<sup>117</sup> Olivera-Bravo S, Isasi E, Fernández A, Rosillo JC, Jiménez M, Casanova G, Sarlabós MN, Barbeito L. *White matter injury induced by perinatal exposure to glutaric acid*. Neurotox Res. 2014 May;25(4):381-91

**Tabla 3.** Anticuerpos primarios utilizados

Antígeno	Tipo	Dilución	Huésped	Célula/estructura "blanco"	Fabricante	Código
GFAP	Monoclonal	1:500	Conejo	Astrocito	Sigma	G3893
S100 $\beta$	Monoclonal	1:500	Ratón	Astrocito	Sigma	S2532
Colágeno IV	Policlonal	1:200	Conejo	Membrana Basal	abcam	Ab6586
Nestina	Policlonal	1:300	Ratón	Cél madre y filamentos intermedios de astrocitos.	Sigma	N5413
CD133	Monoclonal	1:50	Ratón	Cél. madre tumoral	Hybridoma Bank	HB#7
Olig2	Monoclonal	1:300	Conejo	Precusores de oligos/Gliomas difusos	abcam	Ab3427

**Tabla 4.** Anticuerpos secundarios utilizados

Anticuerpo	Fluoróforo	Dilución	Fabricante	Código
Cabra anti-ratón IgG	Alexa Fluor 488	1:600	Molecular Probes® Invitrogen	A-11001
Cabra anti-conejo IgG	Alexa Fluor 546 Alexa Fluor 633	1:600	Molecular Probes® Invitrogen	A-11035 A-21071

### Reclutamiento antigénico para inmunohistoquímica

Para la inmunomarcación con el anticuerpo anti-colágeno IV se realizó reclutamiento antigénico en las muestras de tejido, tal como está indicado para el uso de este anticuerpo en trabajos previamente publicados<sup>118,119</sup>. Los cortes se incubaron en una solución de citrato de sodio 10 mM, (pH=6, en PBS 10 mM) y se calentaron sobre tela de amianto hasta alcanzar una temperatura cercana a la de ebullición. Se

<sup>118</sup> Suenaga K, Kitahara S, Suzuki Y, Kobayashi M, Horie S, Sugawara J, Yaegashi N, Sato Y. *Role of the vasohibin family in the regulation of fetoplacental vascularization and syncytiotrophoblast formation*. PLoS One. 2014 Sep 3;9(9):e104728.

<sup>119</sup> Poissonnier L, Villain G, Soncin F, Mattot V. *Egfl7 is differentially expressed in arteries and veins during retinal vascular development*. PLoS One. 2014 Mar 4;9(3):e90455.

dejaron enfriar durante 20 min sobre tela de amianto, 30 min más en agitador orbital a baja velocidad y se lavaron varias veces con PBS antes de comenzar el protocolo estándar de inmunomarcado.

### **Histoquímica para lectina de tomate**

Las lectinas son proteínas que tienen dominios o secuencias de aminoácidos que son capaces de reconocer y unirse a glúcidos terminales que forman parte de cadenas de oligosacáridos libres o que forman parte de otras moléculas como las glicoproteínas. Gracias a la capacidad que tienen estas moléculas para reconocer y unirse sólo a una molécula determinada presente en el tejido, las lectinas pueden utilizarse para estudiar la distribución tisular de distintos tipos de azúcares de manera específica. Se pueden usar diferentes tipos de lectinas en base a su especificidad de reconocimiento de azúcares determinados<sup>120</sup>. En particular, la lectina de tomate es capaz de reconocer selectivamente las células endoteliales de los vasos sanguíneos y las células de la microglía<sup>95</sup>.

La histoquímica para la lectina de tomate puede realizarse conjuntamente con la incubación de anticuerpos primarios. Brevemente, se permeabilizaron los cortes con Tritón X-100 1% durante 20 min y se incubaron toda la noche con una dilución 1:150 de lectina de tomate biotilada a 4°C en Tritón X-100. Para la visualización de la marca de la lectina se emplearon dos procedimientos, dependientes de la alta afinidad de la biotina por la streptavidina y la avidina. Para incorporar una marca fluorescente, luego de ser lavados los cortes se incubaron por 90 min con una dilución 1:300 de streptavidina conjugada a Alexa Fluor 488 (Molecular Probes® Invitrogen – S32354. Los cortes se lavaron y se montaron con glicerol-PBS (1:1)/Hoechst 1 µg/mL. Los cortes montados se visualizaron en el microscopio confocal.

En otro grupo de cortes incubados con lectina biotilada, la marca de lectina se reveló con cromógeno empleando el kit VECTASTAIN® ABC (Vector Labs) de peroxidasa de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En primer lugar, se preparó el reactivo ABC en las proporciones indicadas. Luego los cortes se incubaron con este reactivo durante 30 min a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces con PBS 10 mM pH7,4 durante 5 min cada vez y se incubaron con una solución de 10 mg/mL de diaminobencidina (DAB) y 3 µL de una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%. La reacción se detuvo con agua corriente luego de la observación del desarrollo de color bajo la lupa. Los cortes se lavaron 3 veces con PBS y luego se montaron con glicerol 50% para ser visualizados al microscopio de luz.

### **Observación de las muestras mediante microscopía láser confocal y microscopía de luz**

El análisis por microscopía láser confocal permite obtener imágenes digitalizadas con buena resolución y gran contraste debido a la eliminación de la luz proveniente de regiones fuera de foco debido a la presencia de un diafragma denominado *pinhole*. El dispositivo además permite realizar cortes ópticos a distintas

---

<sup>120</sup> Alroy J, Goyal V, Skutelsky E. *Lectin histochemistry of mammalian endothelium*. Histochemistry. 1987;86(6):603-7.

profundidades de la sección lo que posibilita el análisis y reconstrucción 3D de la muestra variando el plano de enfoque del sistema.

Para la toma de imágenes y el análisis de las muestras empleadas con fluorescencia se realizó el microscopio confocal institucional Olympus FV300 empleando el software Fluoview 5.0.

Las imágenes de luz fueron adquiridas en un microscopio Olympus IX81 empleando el programa controlador de la cámara Olympus DP71.

## **PRUEBA PILOTO EMPLEANDO TOMOGRAFIA DE EMISIÓN DE POSITRONES**

### **Anestesia**

Los animales fueron anestesiados con isoflurano 4% en flujo de oxígeno 2,5 L/min y posicionados en la cámara trimodal para pequeños animales PET/SPECT/CT (Triumph™, TriFoil Imaging) con que cuenta el Área de I+D Biomédico del CUDIM (**figura 18**). La anestesia fue mantenida a 2-2,5% de isoflurano durante el escaneo PET.

### **Adquisición de imágenes**

La dosis administrada de 18F-FDG fue de 43.4 MBq, inyectados por vía intravenosa en la vena dorsal de la cola. Se adquirieron imágenes estáticas durante 40 min a partir de los 20 min posteriores a la inyección del marcador (LabPET). La dosis administrada de <sup>11</sup>C-MET fue de 41.1 MBq, inyectados por vía intravenosa en la vena dorsal de la cola. Se adquirieron imágenes dinámicas durante 40 min post inyección empleando el programa LabPET.

En todos los casos los estudios se complementaron con la adquisición inmediata de imágenes de tomografía computada (X-O MicroCT) en el mismo equipo para fusión de imágenes, lo que permitió disponer de referencias anatómicas que permiten la localización precisa de los cambios funcionales y su cuantificación.

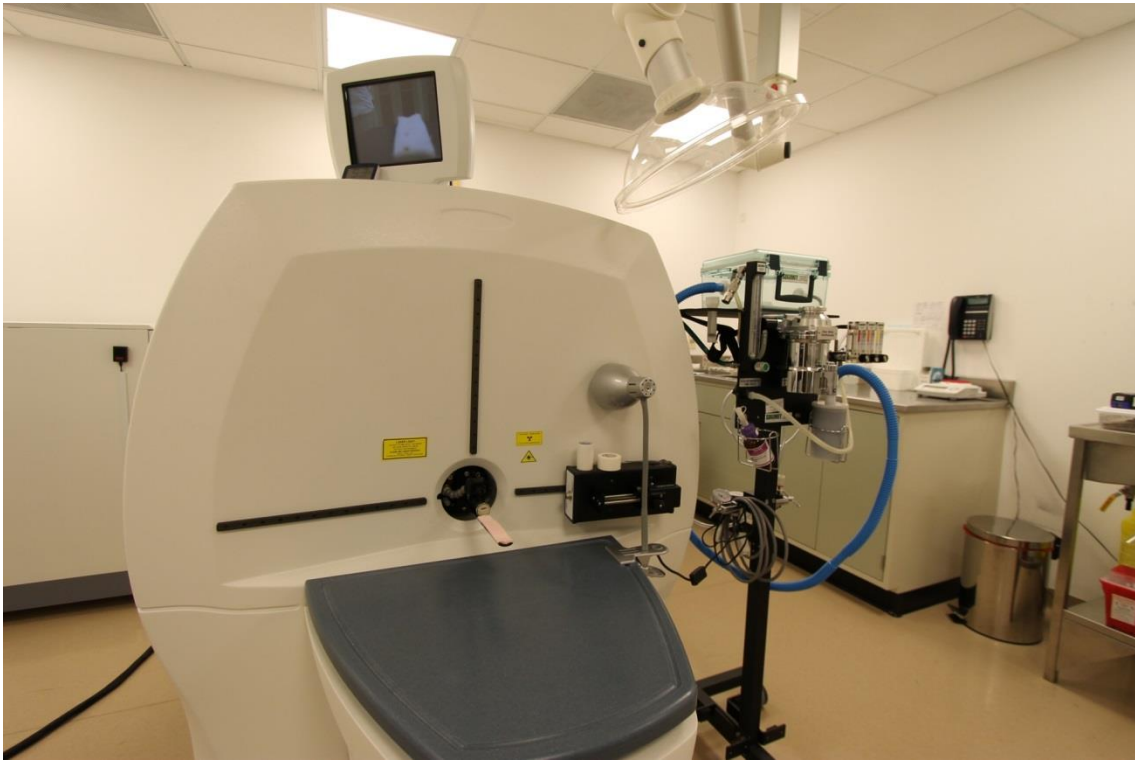
### **Análisis cualitativo de los resultados**

Para el procesamiento de imágenes se utilizó el procedimiento iterativo MLEM (Maximum Likelihood Expectation Maximization) seleccionando 30 iteraciones. Para el procesamiento y cuantificación de las imágenes obtenidas se utilizó el programa PMOD (PMOD Technologies, Zurich) así como plantillas patrón de MRI y el Atlas Paxinos de cerebro de rata, como referencias anatómicas.

La localización anatómica de las áreas de mayor y menor actividad metabólica se realizó a través del co-registro de cada imagen PET obtenida con su correspondiente CT. Los resultados del promedio de captación del radiofármaco en la región de interés (tumor) seleccionada volumétricamente (VOltumor)



fueron expresados a través de la relación con la respectiva región contralateral (VOIcontralateral),  $T/C = (\text{promedio KBq/cc VOI}_{\text{tumor}}) / (\text{promedio KBq/cc VOI}_{\text{contralateral}})$ .



**Figura 18.** Cámara trimodal para pequeños animales PET/SPECT/CT (Triumph<sup>TM</sup>, TriFoil Imaging). Dicha cámara fue utilizada para el experimento piloto.



## RESULTADOS



## A- ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO ANIMAL DE GLIOMA POR CARCINOGENESIS QUÍMICA.

Se realizaron 3 series de experimentos independientes inyectando en cada una a 4 neonatos con MNU y 4 hermanos con vehículo en las condiciones descritas en materiales y métodos. Luego de 4 meses se analizó la posible inducción de tumores mediante un *screening* primario del cerebro utilizando la sonda nuclear Hoechst. Se fijó el tejido y se procedió a hacer cortes seriados a vibrátomo de 50  $\mu\text{m}$  de espesor que luego fueron montados con glicerol/Hoechst (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y analizados por microscopía láser confocal empleando un láser de 405 nm. Otros cortes fueron montados y observados bajo el microscopio de luz para identificar alteraciones histológicas significativas.

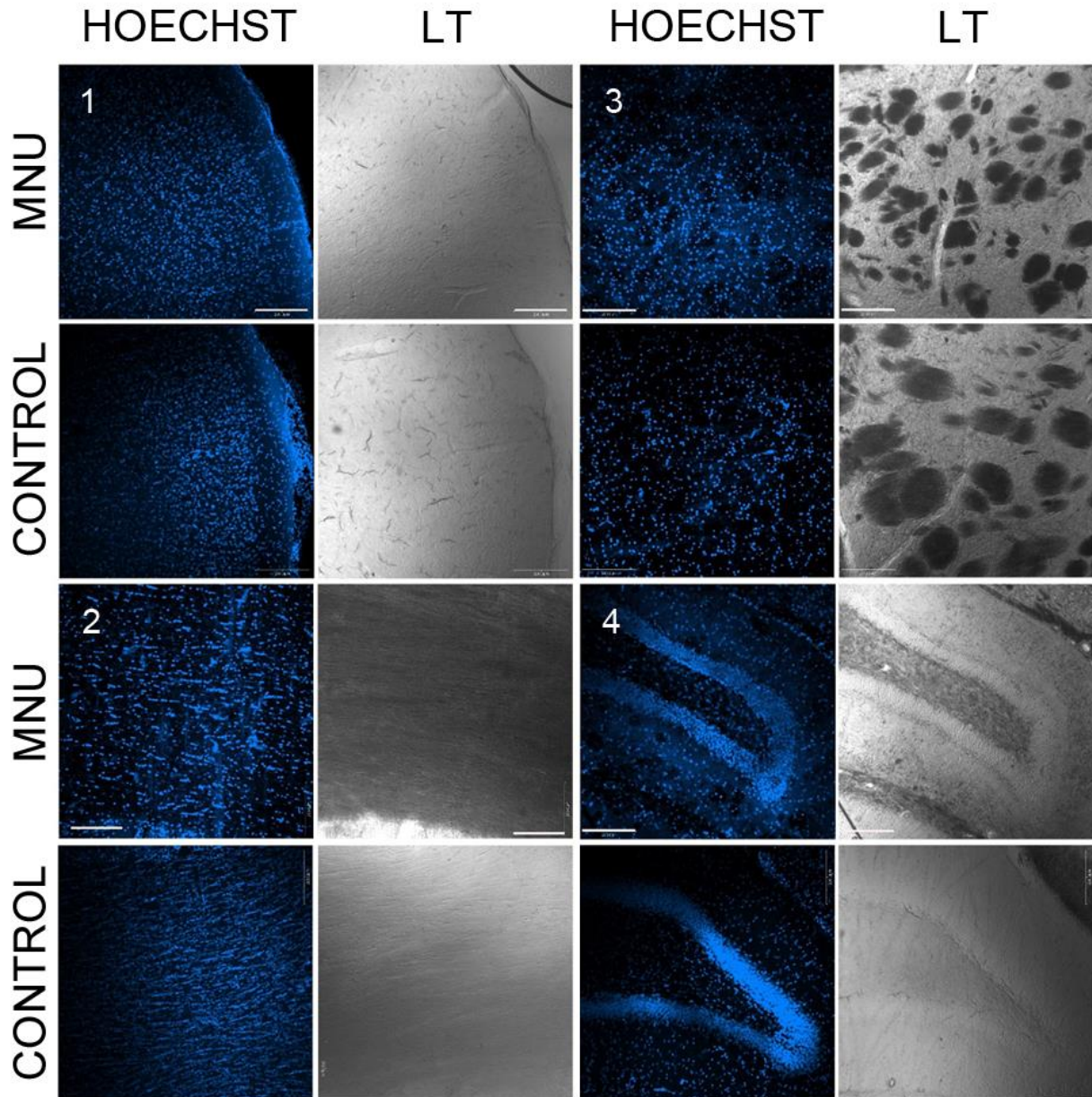
La búsqueda de tumores inducidos se realizó en cortes seriados coronales y sagitales de todo el cerebro y cerebelo de todos los animales tratados con MNU. Los resultados obtenidos muestran ausencia de tumores cerebrales inducidos en el 100% de los animales inyectados (0/12). Las **figuras 19 y 20** muestran cortes coronales y parasagitales representativos de los resultados obtenidos en todos los animales inyectados. Los cortes fueron analizados primero a bajo aumento para identificar densidades nucleares altas que pudieran indicar la formación de una neoplasia. Posteriormente, a mayor aumento, se analizaron estructuras conocidas para identificar la presencia de anomalías morfológicas, infiltración de matriz, núcleos en distintos estadios del ciclo, entre otras características propias de un tejido tumoral.

En ninguna de las estructuras analizadas fue posible encontrar ningún tipo de acúmulo nuclear, a su vez la mielina presentó una estructura normal en el cuerpo calloso donde se distinguen los haces corriendo paralelos y en el estriado donde los haces tienen un tamaño y disposición normal para un individuo de esa edad, indicando que ninguna masa celular se interpone en el curso normal de los axones mielinizados.

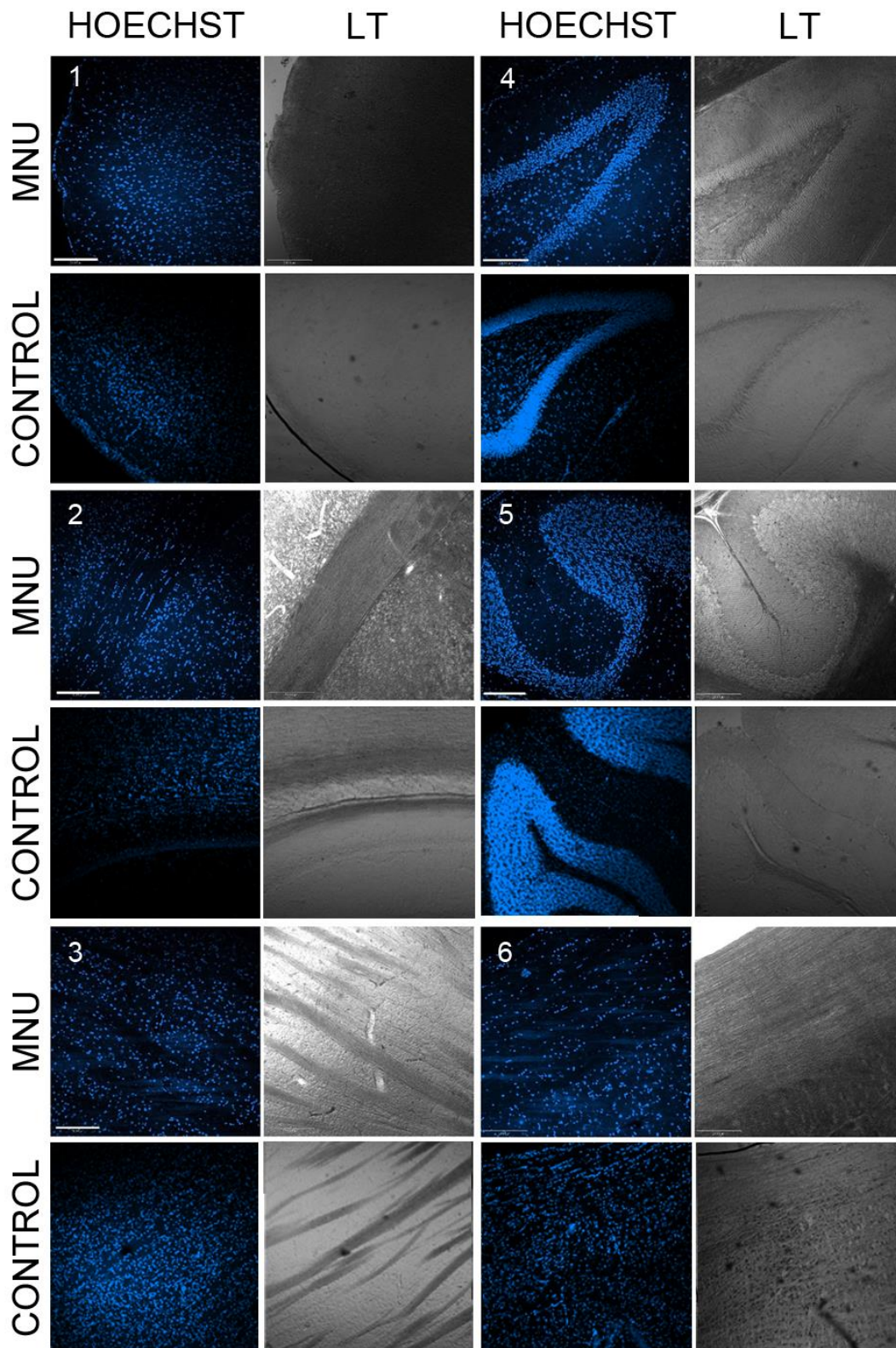
Los cortes sagitales y parasagitales permitieron examinar además el cerebelo (5), el tronco y el comienzo de la médula espinal cervical (6), confirmándose la ausencia de alteraciones significativas en el SNC que pudieran indicar la presencia de tumores.

El análisis de las imágenes obtenidas en animales inyectados con MNU respecto de los controles no permitió detectar ninguna diferencia significativa.

La ausencia de formaciones tumorales en los animales tratados con MNU, evidenciada por la tinción con Hoechst o con LT, llevó a descartar la realización de un análisis inmunohistoquímico más profundo.



**Figura 19.** Cortes coronales de cerebro de un animal inyectado con MNU. Se muestran imágenes representativas tomadas a partir de cortes correspondientes a 0,20-0,30 mm anteriores a bregma (interaual 9,20mm) según el atlas de Paxinos, para la corteza (1), cuerpo caloso (2) y cuerpo estriado lindante con el neuroepitelio y el ventrículo (3). Las imágenes correspondientes al giro dentado del hipocampo (4) se obtuvieron a 4-4,4 mm posteriores a bregma. No se observan acúmulos nucleares ni anomalías en sustancia blanca (visualizándose como zonas compactas y oscuras formadas por haces paralelos en LT). La disposición y morfología nuclear es la esperada en las distintas regiones analizadas y comparables a los controles. *Barra de calibración: 200 $\mu$ m*



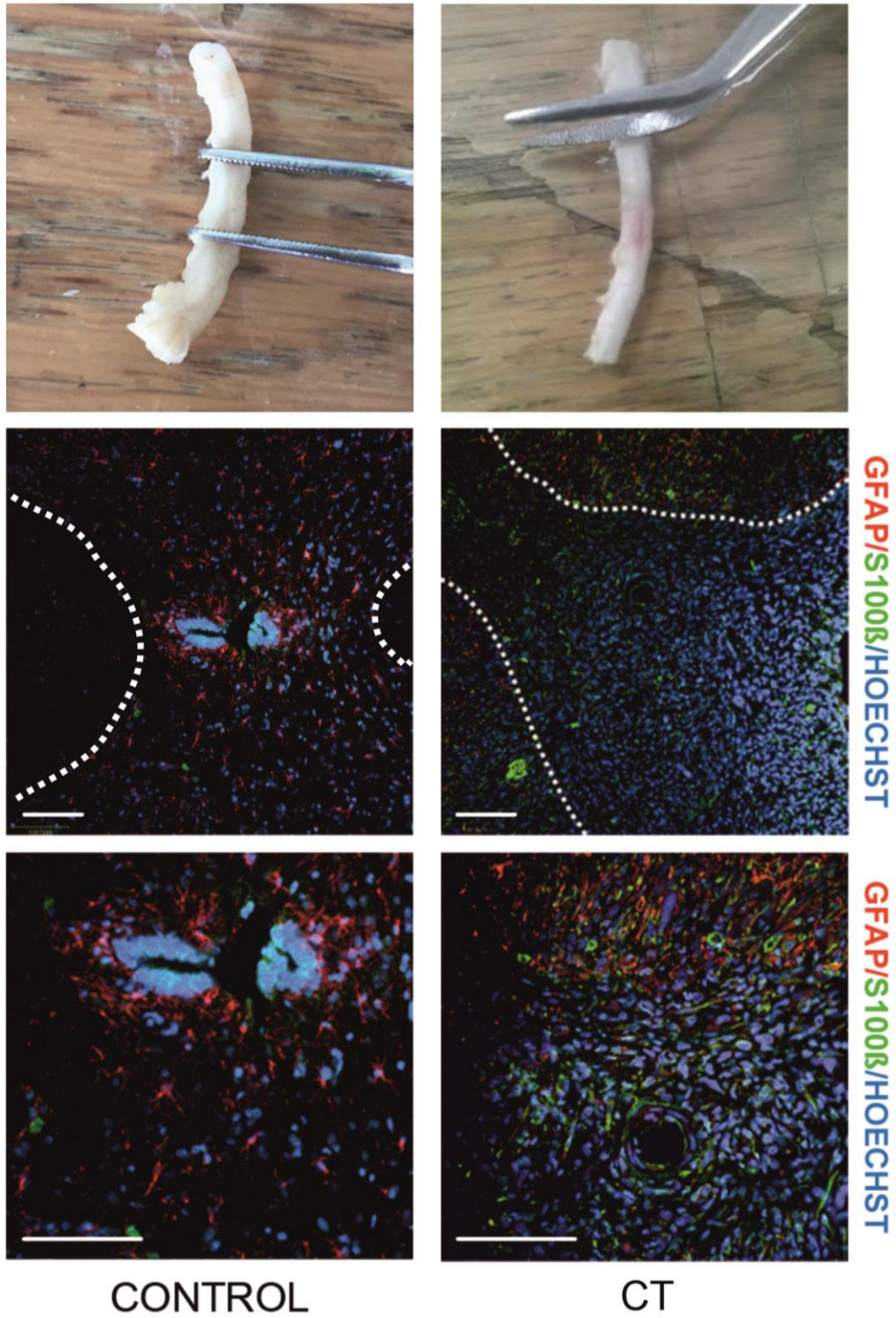
**Figura 20.** Cortes parasagitales de distintas regiones de cerebro y cerebelo de animales inyectados con MNU (aproximadamente 3mm laterales a bregma). Se observan imágenes de la corteza (1), cuerpo calloso (2) y cuerpo estriado lindante con el neuroepitelio y ventrículo lateral (3), giro dentado del hipocampo (4), corteza cerebelosa (5) y médula cervical (6) que se ven normales respecto al control. Obsérvese la falta de acúmulos nucleares y la densidad nuclear esperada de acuerdo a la región que se está analizando. No se observan a su vez anomalías en las zonas de sustancia blanca. *Barra de calibración: 200µm.*

## B- DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE UN MODELO ANIMAL DE TRASPLANTE CÉLULAR ECTÓPICO

Se realizaron 2 series experimentales separadas, cada una con 4 ratas adultas de la misma edad inyectadas con células y otras 4 con igual volumen de vehículo. Se inyectaron 200.000 células transformadas en un volumen de 30  $\mu$ L por vía intracerebroventricular (icv) siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos.

El monitoreo continuo desde la recuperación de la inyección icv permite afirmar que todos los animales inyectados permanecieron sin síntomas o anomalías significativas en su peso ni en su locomoción hasta aproximadamente 30 días posteriores a la inyección. A partir de ese momento, comenzaron a notarse signos de parálisis en los miembros posteriores de 3 de los 4 animales inyectados en la primera tanda. Alrededor de los 40 días posteriores a la inyección, el deterioro de los animales fue extremadamente marcado, observándose una pérdida significativa de peso (15-20% respecto a los controles) además de una parálisis total de los miembros inferiores, por lo que se procedió a eutanizar los animales y procesarlos para su análisis. Los mismos hallazgos se observaron en la segunda serie de experimentos. El análisis de todos los animales inyectados con células transformadas y procesados entre los 35 y 40 días posteriores a la inyección indicó que el 75% de ellos mostró tumores espinales a la altura de la médula torácica. No se detectaron tumores encefálicos en ninguno de los animales inyectados (0/8).

Tal como se observa en la **figura 21**, la administración icv de las células transformadas provocó formaciones anómalas que fueron distinguidas macroscópicamente a nivel de la médula torácica. Las lesiones presentaron un color rojizo y una consistencia al tacto mucho más compacto que el tejido original normal. El *screening* primario de cortes coronales seriados de la médula a la altura de la lesión inducida realizado con Hoechst evidenció la presencia de acúmulos nucleares rodeando el epéndimo. La morfología típica del epéndimo también fue alterada, observándose además una clara pérdida de la citoarquitectura de la médula espinal. Respecto de los animales controles, se perdió la disposición típica de la sustancia gris formando una H con las astas dorsales y ventrales unidas por una delgada comisura gris que contiene el canal ependimario, rodeada por sustancia blanca y que se aprecia en la **figura 21**. Las imágenes obtenidas muestran que al tiempo de procesamiento de los animales, la mayor parte de la médula torácica consistía en tejido tumoral, observándose un desplazamiento del tejido del hospedero por las células transformadas. La inmunomarcación con GFAP (proteína ácida fibrilar glial) o S100 $\beta$  (proteína de unión a calcio), marcadores prototípicos de astrocitos<sup>92</sup> (**figura 21**) mostró que la mayoría de la señal correspondiente a astrocitos fue desplazada a los bordes del neoplasma, observándose poca señal positiva dentro del mismo.



**Figura 21.** Tumores de células transformadas inducidos en médula espinal por la inyección icv de células transformadas. El tumor se evidencia macroscópicamente como una lesión de consistencia diferente en la médula espinal. Microscópicamente se puede distinguir la invasión de las células y desplazamiento del tejido del hospedero. Se observa en contraposición con el control (izquierda) el desplazamiento de las células del canal endodimario y la ausencia de la clásica disposición de la sustancia gris y blanca claramente observable en el control. *Barra de calibración: 50μm*

## C- DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE UN MODELO ANIMAL DE TRASPLANTE CÉLULAR ORTOTÓPICO

### ***La inyección estereotáxica de las células transformadas indujo la aparición de neoplasias cerebrales en animales inmunocompetentes***

Este abordaje fue realizado buscando lograr no sólo la inducción de tumores en regiones cerebrales sino también lograr reproducibilidad en la localización de los tumores inducidos y mejores tasas de éxito. Se inyectaron ratas macho inmunocompetentes de 3 a 4 meses con las células transformadas con MNU mediante cirugía estereotáxica en las adyacencias de la *substantia nigra* (**figura 17**) siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos. Se realizaron 5 series de experimentos con 20 animales inyectados en total incluyendo los animales empleados para análisis funcional mediante PET. En 2 de las 5 tandas de experimentos se inyectaron 3 animales de 3-4 meses con igual número de células C6<sup>72,73,74</sup>.

Los animales inyectados no mostraron ningún síntoma ni signo de deterioro hasta los 30 y 40 días posteriores al trasplante celular. A partir de ese tiempo, los animales inyectados comenzaron a mostrarse con la cabeza hacia un lado y perdiendo la postura típica de los miembros posteriores cuando eran levantados de la cola. El reflejo de estirar los miembros “formando una T” se perdió. Con el transcurso de cada día, los animales inyectados se observaron letárgicos con pérdida de movimiento aunque no se observó pérdida de peso significativa respecto a los controles. El rápido empeoramiento de los síntomas, llevó a decidir que 40 días post-trasplante eran el punto final de los experimentos. En total, el 90% de los animales inyectados con células transformadas (18/20) desarrolló tumores cerebrales. Las neoplasias cerebrales inducidas fueron claramente apreciables a simple vista ya sea por la coloración y consistencia diferentes, como por la presencia de hemorragias localizadas en sus límites.

El análisis de secciones de cerebro extraído a diversos tiempos post inyección con el marcador de ácidos nucleicos, azul de metileno<sup>89,112</sup> permitió apreciar la evolución del tumor durante todo el tiempo experimental tal como se aprecia en la **figura 22**.

En lo que respecta al análisis histológico durante las tres primeras semanas posteriores a la inyección, si bien a los 14 días fue posible distinguir una lesión alrededor de la zona donde se realizó la inoculación de las células transformadas, no se puede afirmar que haya un gran crecimiento del neoplasma en este tiempo. La metodología empleada evidenció el crecimiento invasivo del tumor a partir de la tercera semana, logrando formar una masa de tamaño y volumen considerable que fue capaz de propagarse a otras regiones desde el sitio de inyección. La apariencia y volumen de todos los tumores inducidos, así como su localización, fue comparable en todos los animales analizados.

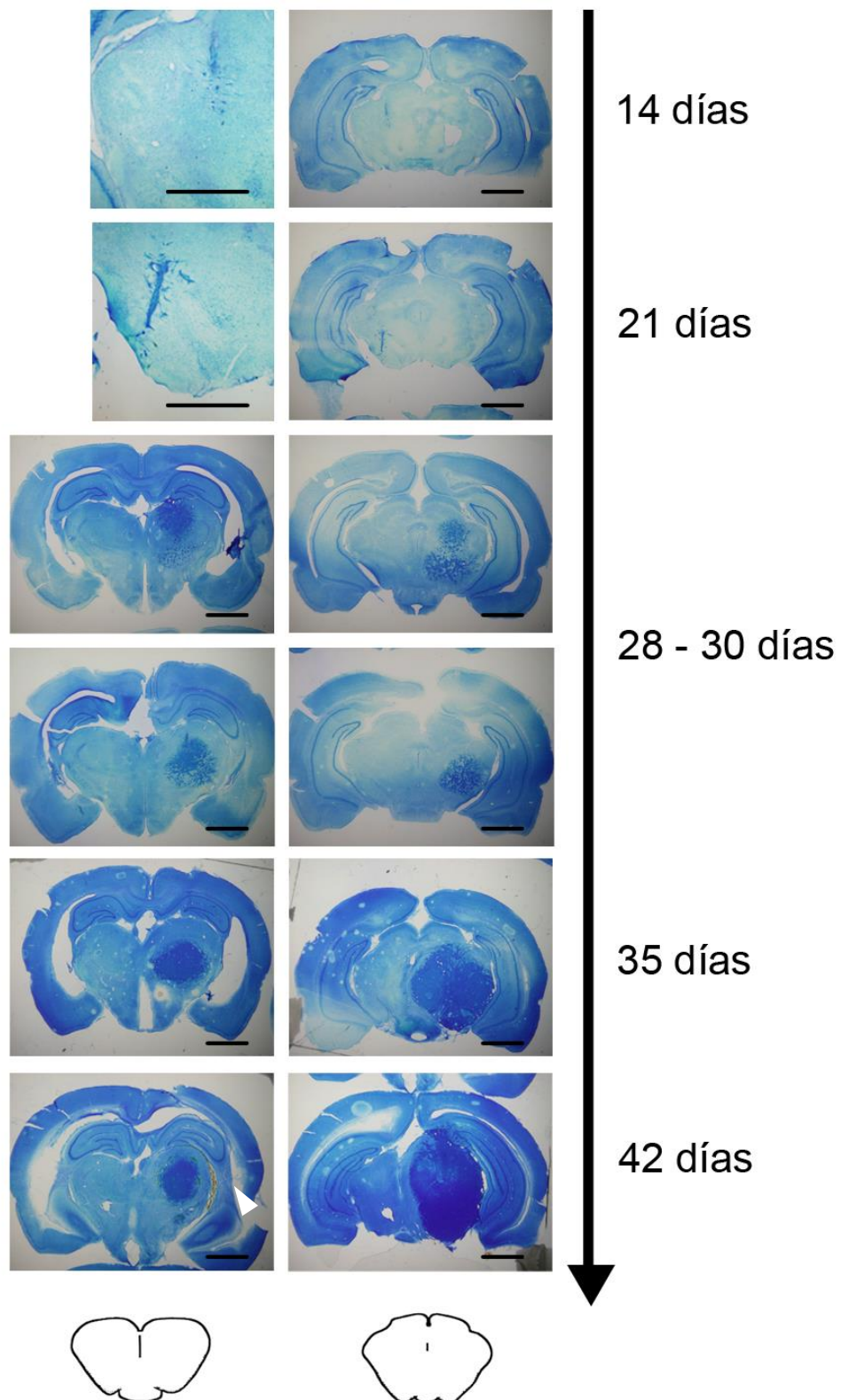


### ***La inyección de células C6 también provocó la aparición de neoplasias cerebrales***

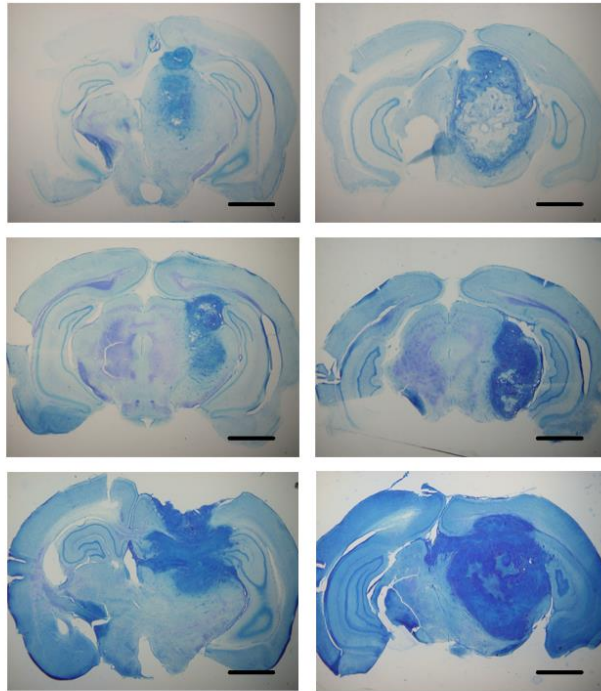
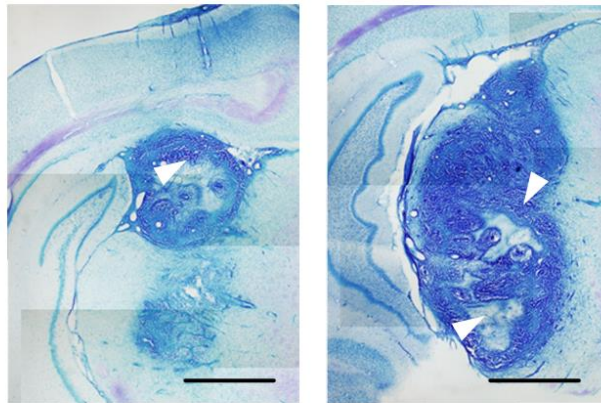
La línea tumoral de rata C6 fue seleccionada como control de los experimentos porque es una línea altamente validada a pesar de que los modelos de glioma por trasplante de C6 no suelen ser exitosos, probablemente debido a su alta inmunogenicidad<sup>66</sup>.

Contrariamente a las expectativas, 3 de 6 animales inyectados con C6 en las adyacencias de la *sustancia nigra* desarrollaron tumores cerebrales entre los 30-40 días posteriores a la inyección, aunque para estos animales fue difícil determinar la aparición de sintomatología en forma clara y progresiva.

Los tumores cerebrales inducidos por inyección de las células C6 (**figura 23A**) fueron claramente apreciables a simple vista pero difieren en aspecto y consistencia con los tumores inducidos por las células transformadas con MNU. Los tumores generados por C6 no son tan duros y fibrosos al tacto, parecen tener bordes más suaves y muestran zonas necróticas de área considerable (**figura 23B**). Además, se constató una diferencia apreciable en el tamaño de los tumores obtenidos en animales inyectados con C6 al mismo tiempo posterior a la inyección.



**Figura 22.** Curso temporal de los tumores inducidos por administración estereotaxica de células transformadas con MNU. Se muestran imágenes de secciones de cerebro teñidas con azul de metileno de animales inyectados a diversos tiempos post-inyección. Se distinguen los tumores como acúmulos azules intensos en el cerebro medio rostral y caudal (al nivel detallado en los esquemas inferiores) en el lado de la inyección. La morfología de los tumores mismos evidencia el crecimiento invasivo hacia el parénquima hasta formar una masa sólida hacia los estadios finales. La flecha señala zonas de hemorragia causada por el tumor. *Barra de calibración: 1mm*

**A****B**

**Figura 23.** Tumores inducidos por inyección de C6. A- Se observan los tumores obtenidos a tiempo final en 3 animales distintos. Distintas ubicaciones y tamaños fueron observados, mostrando una menor reproducibilidad del modelo. Los tumores a tiempo final muestran zonas necróticas claramente distinguibles como regiones claras dentro de la masa tumoral B- En este panel se muestra en mejor definición imágenes correspondientes a uno de los tumores en el panel A, señalándose con puntas de flecha las zonas necróticas *Barra de calibración: 1mm.*

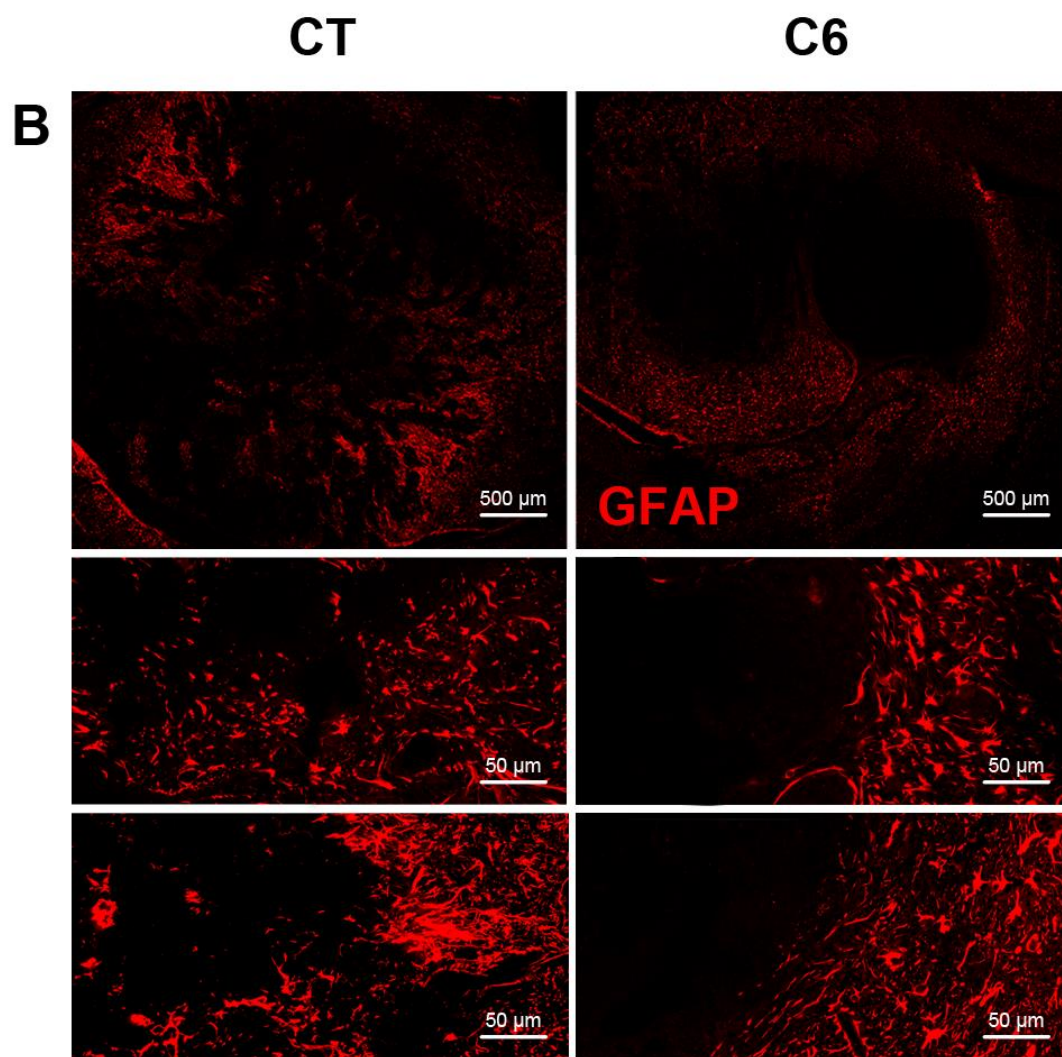
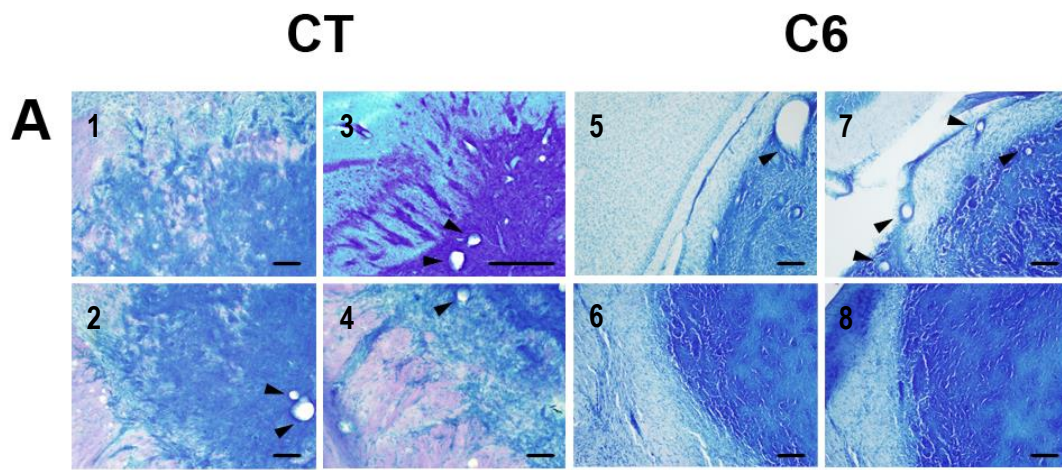
## CARACTERIZACIÓN PRIMARIA DE LOS TUMORES INDUCIDOS

### *Los tumores inducidos por inyección de células transformadas son infiltrantes*

El carácter infiltrante es un rasgo importante y distintivo de los gliomas que generalmente no es reproducido en los modelos de trasplante de células.

El análisis con azul de metileno de los bordes de las lesiones inducidas por inyección de células transformadas con MNU muestra claramente que las neoplasias generadas presentaron forma irregular con bordes externos poco discernibles y se adentraron en las estructuras circundantes al tumor (**figura 24A 1-4**). Las lesiones ocasionadas por trasplante de C6 presentaron bordes curvos discernibles, no observándose células fuera de la masa tumoral primaria que generalmente estuvo delimitada en forma bastante clara (**figura 24A 5-8**).

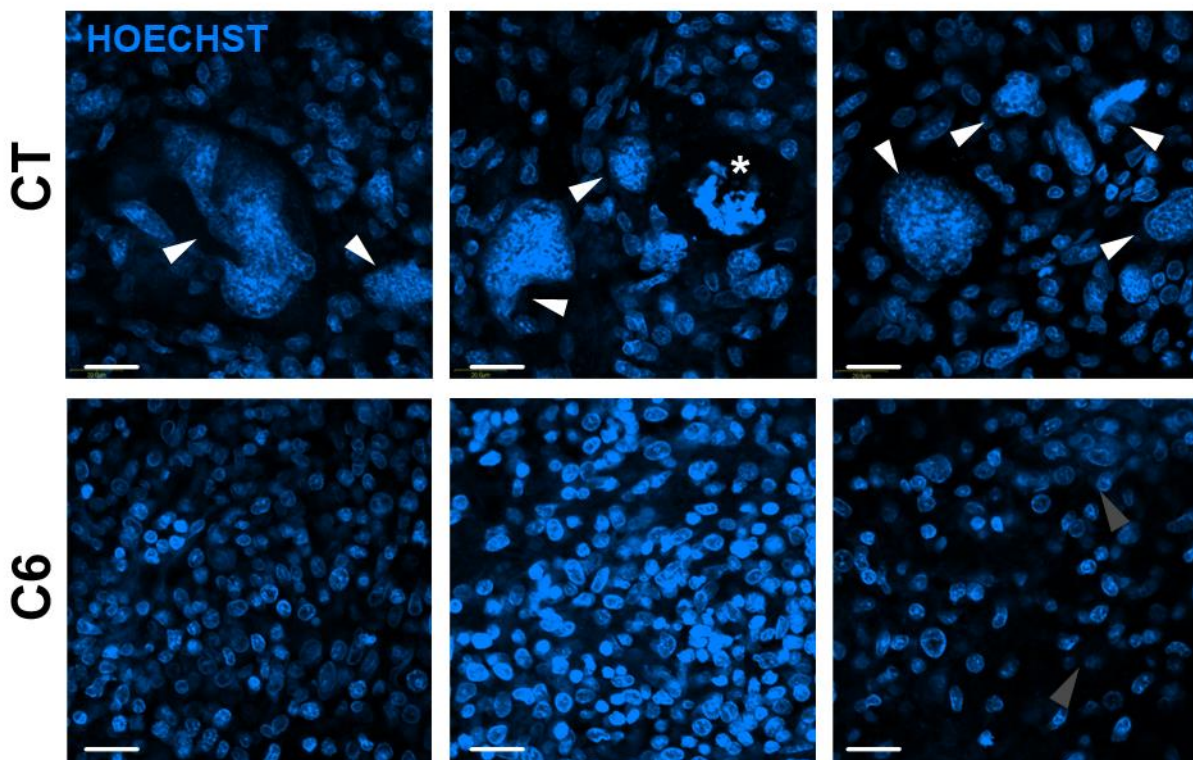
Las imágenes de inmunohistoquímica contra GFAP en tumores inducidos por las células transformadas muestran que el crecimiento tumoral fue infiltrante dada la marcación para GFAP presente en el interior del tumor, el cual fue negativo para dicha proteína (**fig. 24B**). En tanto, en los tumores inducidos por células C6 se observa una lesión redondeada negativa para GFAP que está claramente delimitada por una barrera astrocitaria positiva para GFAP. El recorrido desde una zona límite del tumor hacia su interior muestra señal de GFAP en los tumores generados por células transformadas mientras que en el caso de C6 no se observó señal hacia el interior, sugiriendo que los astrocitos se encuentran en el borde y hacia afuera del tumor.



**Figura 24.** Carácter infiltrante de los tumores inducidos. A- Zonas límite de los tumores de CGT y C6 observadas con azul de metileno. Varios grupos de células se distinguen en los tumores de células transformadas, dando una apariencia de bordes difusos. Se observan bordes bien redondeados en los tumores de C6. Las puntas de flecha señalan vasos sanguíneos. *Barra de calibración: 200 μm*. B- la inmunohistoquímica para GFAP partiendo del borde de los tumores muestra la presencia de astrocitos del hospedero en regiones más internas de los tumores de células transformadas evidenciando su crecimiento infiltrante. Contrariamente, en los tumores inducidos por células C6, los astrocitos se observan dispuestos formando una barrera alrededor del tumor.

### **Núcleos atípicos en tumores inducidos por inyección de células transformadas**

El análisis de las secciones montadas con glicerol-Hoechst evidenció que los tumores generados con células transformadas muestran núcleos atípicos (**figura 25**, flechas blancas) con diferencias significativas en tamaño, forma y grado de condensación de la cromatina que aparecen junto a núcleos de forma y tamaños homogéneos. Los núcleos considerados atípicos son de gran tamaño, muchos de ellos son polilobulados o presentan formas complejas y la cromatina aparece muy condensada probablemente reflejando alta actividad mitótica<sup>121</sup>. En los campos analizados, frecuentemente se encuentran figuras mitóticas (**figura 25**, asterisco). En el caso de los tumores generados por inyección de células C6, los núcleos son más homogéneos, predominando un solo tamaño. No obstante, se identifica un bajo porcentaje de escasos núcleos que conservan el aspecto y forma similar de los anteriores (**figura 25**, flecha gris) pero presentan un tamaño de aproximadamente el doble que los núcleos normales, probablemente indicando que están en fase S<sup>122</sup>.



**Figura 25.** Morfología nuclear visualizada utilizando una Hoechst. En los paneles superiores correspondientes a los tumores de CGT se visualizan núcleos claramente atípicos (flecha blanca), exhibiendo un marcado pleomorfismo y una cromatina condensada. Se distinguen también figuras mitóticas (asterisco). En los paneles inferiores se visualizan los núcleos de los tumores de C6, los cuales no presentan ninguna atipia marcada.

<sup>121</sup> Chen D, Dundr M, Wang C, Leung A, Lamond A, Misteli T, Huang S. *Condensed mitotic chromatin is accessible to transcription factors and chromatin structural proteins.* J Cell Biol. 2005 Jan 3;168(1):41-54. Epub 2004 Dec 28.

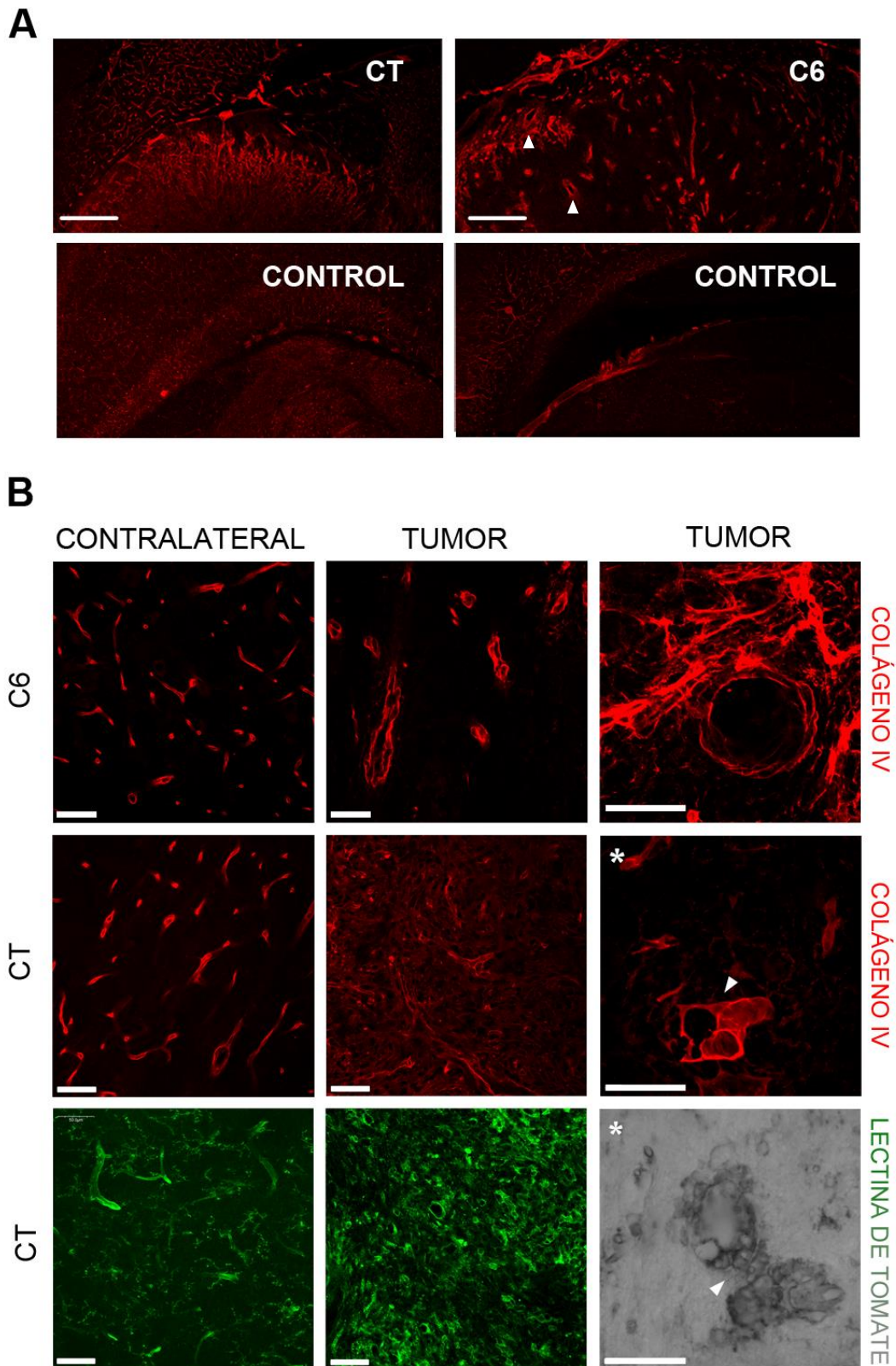
<sup>122</sup> O'Connor, C. *Cell Division: Stages of Mitosis.* Nature Education. 2008 1(1):188

### ***Los tumores inducidos por ambos tipos celulares presentan alteraciones vasculares***

El análisis de los perfiles de los vasos cerebrales mediante inmunohistoquímica con colágeno IV evidenció un aumento en la proliferación vascular en las áreas correspondiente a los tumores inducidos por ambos tipos celulares respecto al control, tal como se aprecia a bajo aumento (**figura 26A**) en dónde la marcación con colágeno IV en la zona del cerebro medio es fuerte. Sin embargo, los perfiles vasculares son claramente distintos en ambos tipos de tumores. En los tumores producidos por células transformadas en las zonas cercanas al límite se observa una mayor desorganización de los vasos que parecen tender a formar redes complejas. Los tumores inducidos por C6 presentaron una vascularización considerable, pero los vasos tienen una morfología más cercana a la descrita en condiciones control. No obstante, algunos de ellos parecen tener un calibre aumentado ya que son claramente distinguibles aún a bajos aumentos (**figura 26A**, flechas blancas)

El análisis a mayor aumento (**figura 26B**), de las áreas tumorales y su comparación con vasos presentes en el lado contralateral evidencia que los vasos sanguíneos de los tumores inducidos son morfológicamente distintos de los normales. Incluso en los bordes, ambos tipos de tumores muestran vasos sanguíneos tortuosos con paredes desorganizadas y anormales. No obstante, los vasos de los tumores inducidos por las células transformadas son claramente más desorganizados y algunos de ellos muestran un fenotipo “glomeruloide” (señalados con puntas de flechas en la **figura 26B**) típicos de la angiogénesis observada en GBM<sup>93</sup>. En los tumores de C6 no se encontraron vasos con este fenotipo, aunque se identificaron vasos de gran calibre (**figura 26B**, asterisco gris).

Si bien la tinción con lectina es menos específica que el inmunomarcado con colágeno IV, fue suficiente para revelar la presencia de vasos glomeruloides en los tumores de células transformadas, tal como se aprecia en la **figura 26B**.



**Figura 26.** Perfiles vasculares de los tumores inducidos por ambos tipos de procedimientos. A- Perfil vascular global. Pueden apreciarse las diferencias en la vasculatura en ambos modelos. *Barra de calibración: 500 $\mu$ m.* B- Vasculatura aberrante del tumor en comparación a la vasculatura normal en el lado contralateral, se distingue desorganización y ausencia de disposición característica. La lectina de tomate marca además la microglía en el contralateral. Vasos característicos se ven a la derecha a mayor aumento, inclusive los vasos glomeruloides señalados con puntas de flecha, reminiscentes a los glomérulos renales, producto de la proliferación endotelial. *Barra de calibración: 50 $\mu$ m.*

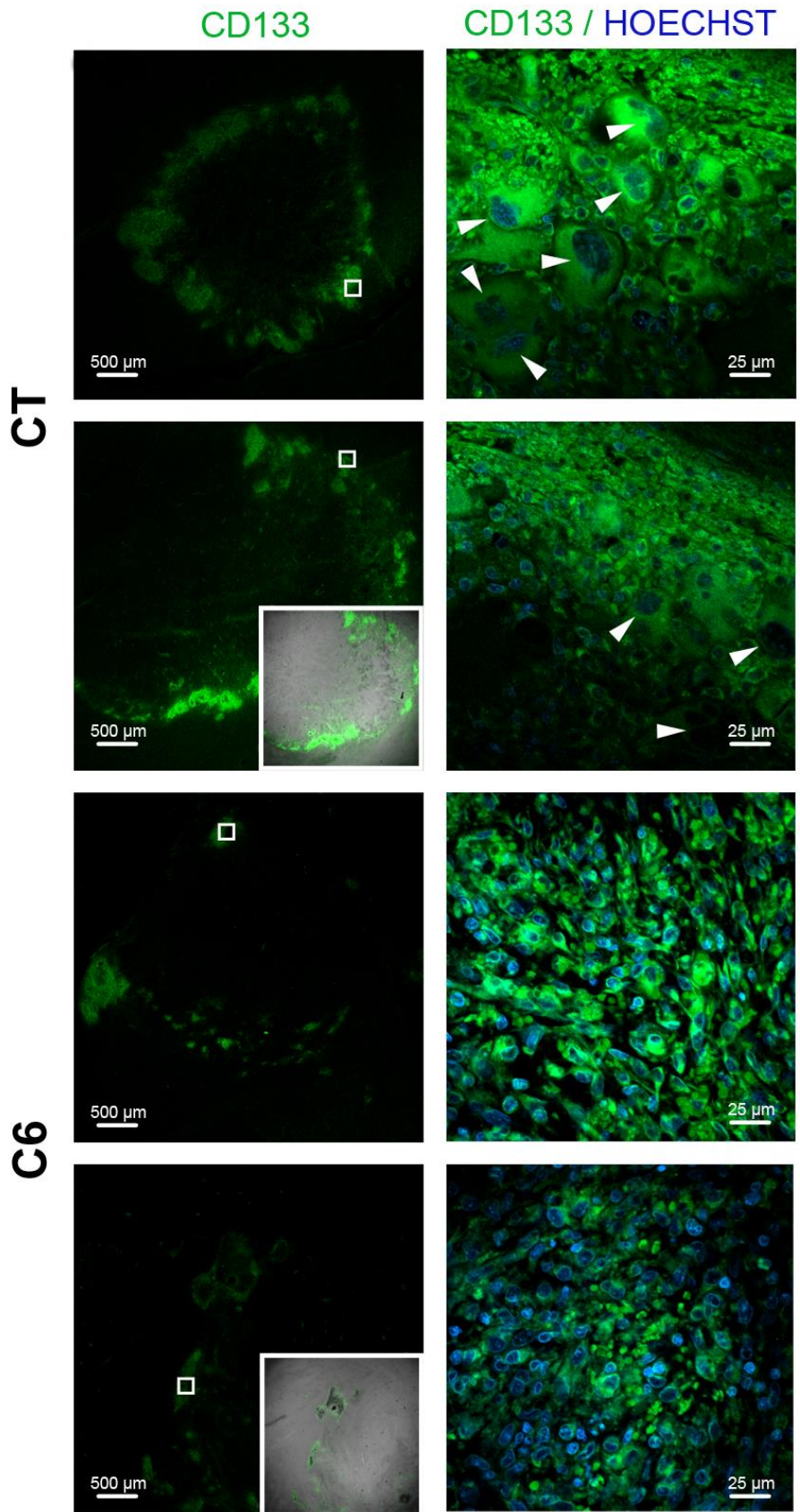


### ***Expresión de marcadores de célula madre tumoral y de precursores gliales en los tumores inducidos***

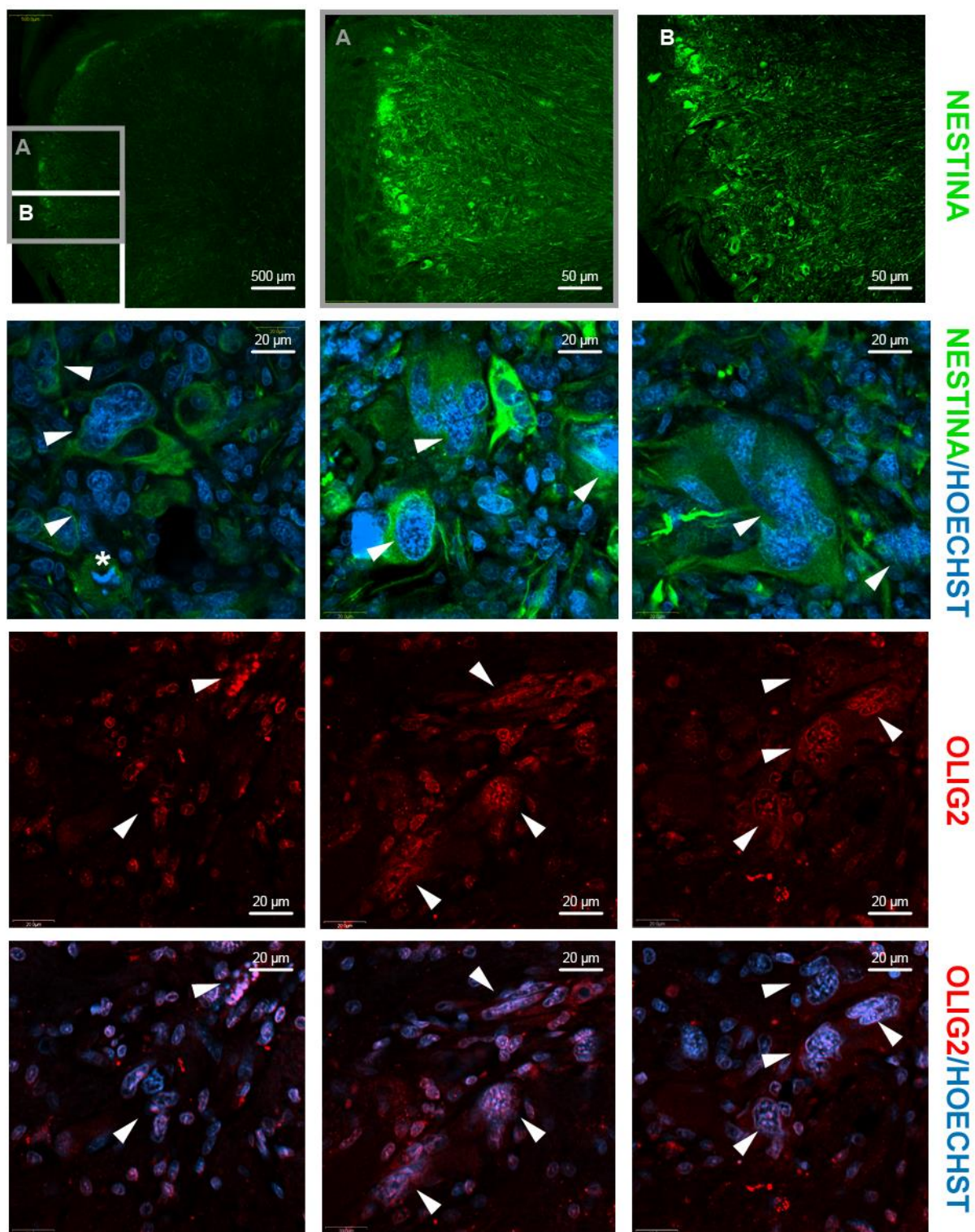
La señal del marcador de células tumorales CD133<sup>97,98</sup> fue detectada en las zonas periféricas de los tumores inducidos por células transformadas y por células C6, aunque la extensión e intensidad de la marca fue mayor en los primeros. El análisis a mayor aumento permitió identificar que la señal se encuentra preferentemente en las células que se ubican en la periferia independientemente de su morfología y tamaño (**figura 27**). Más del 99% de las células presentes en los bordes de los tumores inducidos por células C6 fueron positivas a CD133, confirmando la homogeneidad celular del tumor que además se aprecia por la morfología conservada en todas las células marcadas.

Los tumores inducidos por las células transformadas fueron positivos a nestina en la periferia y el interior (**figura 28**). El análisis a mayor aumento (**figura 28 A, recuadros A y B**) permitió distinguir los distintos grados de inmunorreactividad para este marcador, el que tuvo mayor señal en las células con atipias nucleares (punta de flecha) y alta actividad mitótica (asterisco).

Los tumores inducidos por trasplante de células transformadas fueron además altamente positivos a Olig2 principalmente en los núcleos (inclusive los atípicos, señalados con punta de flecha en la **figura 28B**) y el citoplasma aunque a menor intensidad.



**Figura 27.** Expresión de CD133 en los bordes de tumores inducidos por CT y C6. A bajo aumento se aprecia una señal positiva para CD133 en los bordes del tumor. Los insertos muestran imágenes de LT superpuestas a las de fluorescencia ubicando efectivamente las zonas CD133+ en la periferia del tumor, que se distingue gracias al cambio de consistencia del tejido. A mayor aumento, se distingue la expresión de este marcador, abarcando incluso poblaciones morfológicamente diferentes en los tumores de células transformadas (se señalan atipias nucleares con la punta de flecha).



**Figura 28.** Expresión de marcadores de células madre y de precursores gliales en tumores inducidos por células transformadas. A- Se muestra la expresión de nestina general y la heterogeneidad de la marca a nivel celular (recuadros A y B y a mayor aumento). Las células de apariencia aberrante (punta de flecha) muestran fuerte expresión de nestina. B- Expresión de Olig2 en los núcleos de los tumores de células transformadas, incluidos los atípicos señalados en la figura.

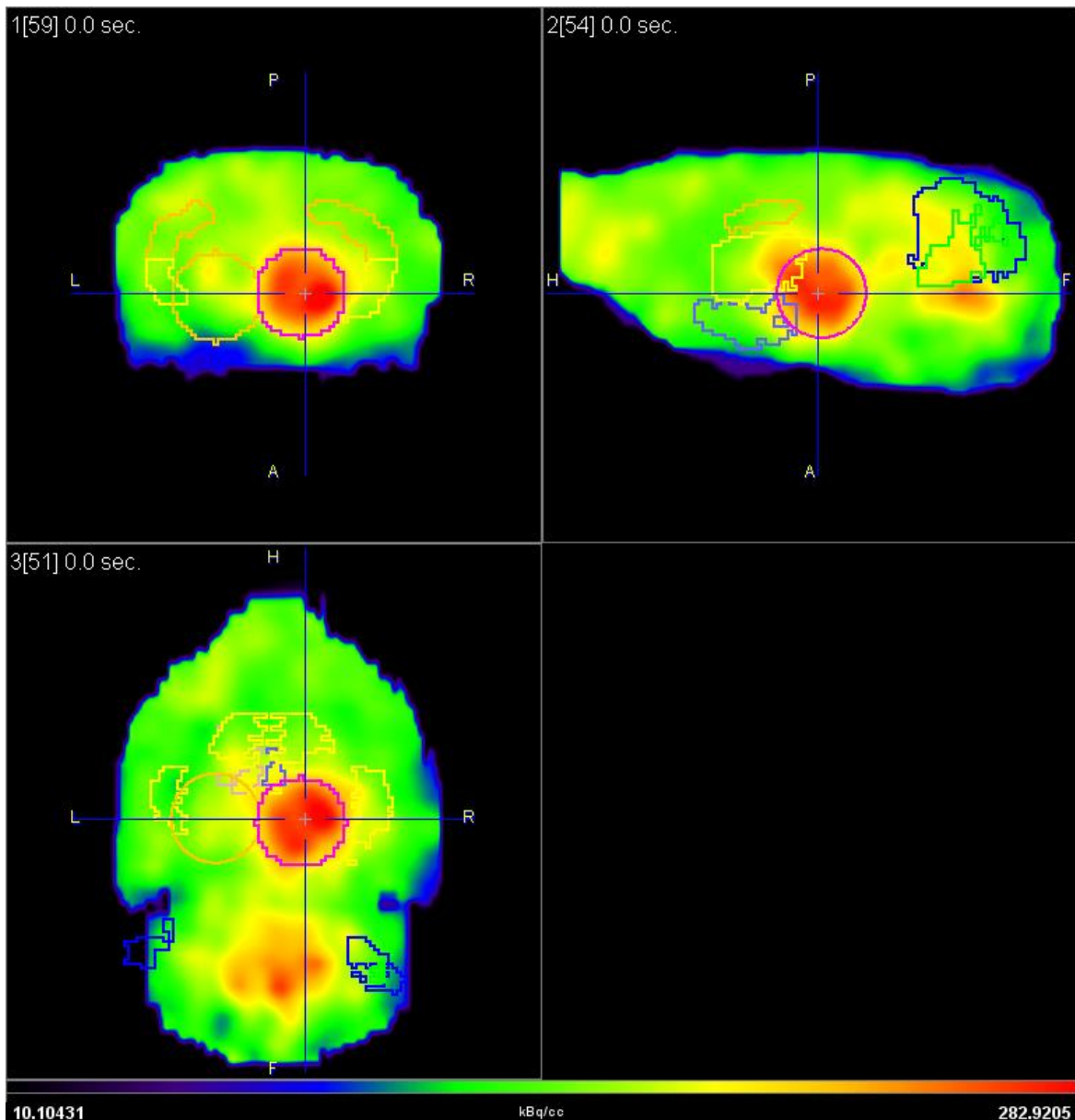
### **Los tumores de CTs se pueden visualizar por PET a tiempo final**

La prueba piloto de análisis de PET realizada en dos series experimentales de 4 animales cada una indicó que los tumores inducidos en 6/8 animales inyectados presentaron una captación diferencial de  $^{18}\text{F}$ -FDG y  $^{11}\text{C}$ -MET entre los 35 y 40 días luego del trasplante celular.

Las imágenes correspondientes a la captación de cada radiofármaco (**figuras 29 y 30**), para el mismo animal tras un período de 42 días post-inyección, muestran el mayor consumo de cada radiofármaco en el área correspondiente al tumor.

A diferencia de la uniformidad de la señal que muestra el mayor consumo en el sitio del tumor con el  $^{18}\text{F}$ -FDG (**figura 29**), la captación de  $^{11}\text{C}$ -MET (**figura 30**) no fue tan uniforme, observándose más áreas frías y *hot spots*, aunque aún se puede observar nítidamente el tumor.

La medida de los valores relativos de captación en el sitio del tumor respecto del sitio homólogo contralateral indica que el tumor tiene un consumo metabólico diferencial para ambos radiofármacos, tal como se aprecia en la **tabla 5**.



**Figura 29.** Captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG. El tumor se muestra en rojo indicando la mayor captación en una escala artificial de colores, está delimitado por un círculo fucsia, posicionado a partir de las coordenadas que fueron obtenidas según el lugar de la inyección y las observaciones al procesar el tejido del animal. El lado contralateral se encuentra delimitado por un círculo naranja. Debido a que las imágenes para la captación de este radiofármaco se adquieren de manera estática la lámina corresponde a un promedio de la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG de los 40 minutos durante los que se hizo la adquisición.

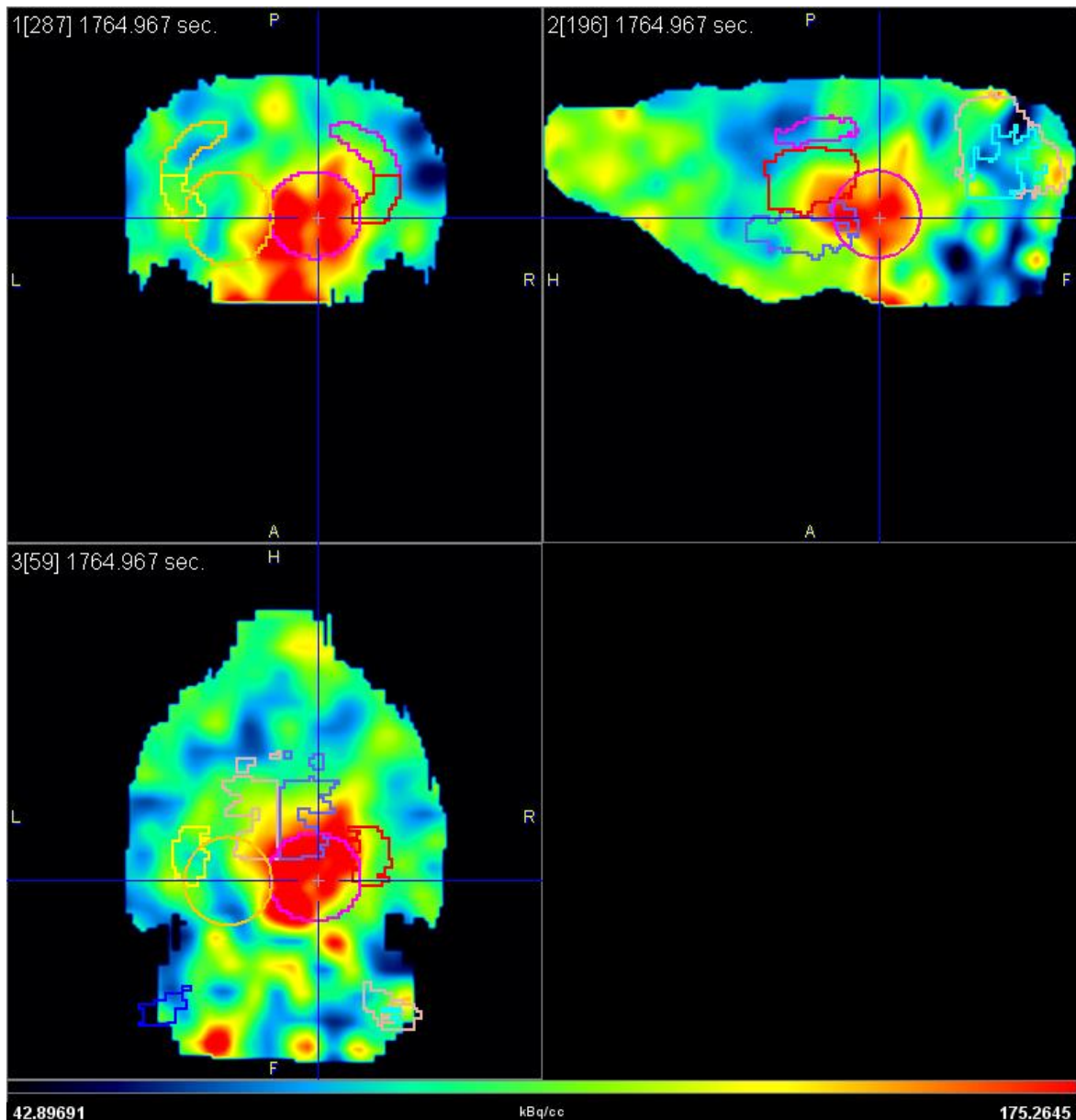


Figura 30. Captación de  $^{11}\text{C}$ -MET. El tumor y su contralateral están delimitados por los círculos fucsia y naranja respectivamente. En este caso la imagen corresponde a la captación de radiofármaco en los últimos 20 minutos de la adquisición, una vez que el radiofármaco es distribuido a través de la circulación por todo el organismo. Recordemos que para  $^{11}\text{C}$ -MET (por los tiempos de decaimiento del  $^{11}\text{C}$ ) la adquisición se realiza inmediatamente después de la inyección y las imágenes se adquieren de forma dinámica.

Tabla 5. Captación promedio de radiofármaco por región analizada.

Radiotrazador	VOI (región)	Captación promedio (kBq/cm <sup>3</sup> )	T/C
$^{18}\text{F}$ -FDG	TUMOR	237.560158	1,5
	CONTRALATERAL	159.382471	
$^{11}\text{C}$ -MET	TUMOR	169.144187	1,6
	CONTRALATERAL	108.311693	



# DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES



Los resultados presentados en esta tesis nos permiten afirmar que se ha logrado tener a disposición un nuevo modelo de tumorigénesis cerebral que es apto para el estudio de la biología básica de los gliomas y parece ser una herramienta potencial para el estudio de abordajes terapéuticos y diagnósticos. Empleando las propiedades carcinogénicas del nitrosocompuesto MNU se realizaron tres aproximaciones experimentales: inyección directa del carcinógeno a neonatos (modalidad A) mientras que las modalidades B y C involucraron el uso del MNU para transformar células y trasplantarlas a animales inmunocompetentes mediante un trasplante ectópico (B) y uno ortotópico (C). Mientras que la modalidad A no fue exitosa, las otras dos modalidades condujeron a la aparición de neoplasias en el SNC. Dado a su reproducibilidad, alta tasa de aparición de tumores y éxito observado a la hora de realizar la cirugía, además de las ventajas relacionadas a la conservación de las interacciones con el microambiente que han sido relacionadas a mejores *outputs*<sup>85,86</sup>, la modalidad C fue la elegida para cumplir con el objetivo 2. La caracterización primaria del modelo de trasplante ortotópico de células transformadas reveló que los tumores inducidos poseen características histopatológicas similares a los gliomas humanos de alto grado, incluso algunas difíciles de recrear como el carácter infiltrante que no ha sido reportado en modelos establecidos que emplean células C6.

#### **A- FALLA EN LA INDUCCIÓN DE TUMORES CEREBRALES MEDIANTE CARCINOGENÉISIS QUÍMICA**

El análisis histológico de los cerebros de las ratas de 4 meses inyectadas icv con 200 µg/g de MNU en su primer día de vida mostró la ausencia de formaciones que puedan corresponderse con la aparición de un glioma. La ausencia de tumores inducidos puede estar relacionada con varios factores como la dosis, el tiempo final que se eligió para el experimento, el diseño del mismo y la edad de los animales. En cuanto a la dosis a la que fueron expuestos los neonatos, podría no haber sido suficiente para desencadenar los eventos mutagénicos necesarios para conducir posteriormente a una neoplasia. No obstante, se ha reportado que MNU en dosis del mismo rango que las administradas a los neonatos en nuestro estudio fueron suficientes para desencadenar cáncer de mama<sup>123</sup>, próstata<sup>124</sup> y colorectal<sup>125</sup> en ratas adultas de distinto sexo y especie. En lo referente al tiempo de espera entre la inyección y el momento en que los animales fueron sacrificados (120 días), ya que esta ventana temporal fue suficiente para inducir tumores de tamaño considerable en el modelo original donde la exposición al MNU se producía por vía transplacentaria<sup>60</sup>. Además, cantidades de MNU similares a las empleadas en nuestro abordaje fueron suficientes para desarrollar tumores de colon de características y volumen considerados suficientes para

---

<sup>123</sup> Gullino PM, Pettigrew HM, Grantham FH. *N-nitrosomethylurea as mammary gland carcinogen in rats*. J Natl Cancer Inst. 1975 Feb;54(2):401-14.

<sup>124</sup> Sarkar DK, Boyadjieva NI, Chen CP, Ortigüela M, Reuhl K, Clement EM, Kuhn P, Marano J. *Cyclic adenosine monophosphate differentiated beta-endorphin neurons promote immune function and prevent prostate cancer growth*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Jul 1;105(26):9105-10.

<sup>125</sup> Ahmed HH, Aglan HA, Zaazaa AM, Shalby AB, El Toumy SA. *Quercetin Confers Tumoricidal Activity Through Multipathway Mechanisms in A N-Methylnitrosourea Rat Model of Colon Cancer*. Asian Pac J Cancer Prev. 2016 Nov 1;17(11):4991-4998.



ser sometidos a terapias con antioxidantes como la quercetina<sup>124</sup>. Un aspecto a mejorar podría ser la solución en la cual se disuelve el MNU sustituyéndola por una solución levemente ácida (pH=6,0) que podría ayudar a mantener la estabilidad química del MNU lo que podría tener un efecto positivo en la inducción de tumores<sup>59</sup>. Sin embargo, la concentración usual de trabajo del MNU puede llegar hasta 10 mg/mL en agua o en solución acuosa, sin que se reporten mayores problemas en cuanto a estabilidad del compuesto en solución acuosa<sup>59</sup>. Finalmente, el abordaje de inyección única podría ser discutible, teniendo en cuenta que tanto los modelos de cáncer de mama<sup>123</sup> como el de inducción de cáncer colorectal<sup>125</sup>, la dosis total de carcinógeno se administró en varias inyecciones, mientras que con el abordaje empleado se hizo solo una, tal como en el modelo original de Duckrey<sup>60</sup>, el cual no sólo ocasiona neoplasias gliales sino que también está dirigido a animales en desarrollo y no a adultos.

## **B- INDUCCIÓN DE TUMORES ESPINALES MEDIANTE TRASPLANTE CELULAR ECTÓPICO**

Dado el primer objetivo tendiente a lograr un modelo de carcinogénesis cerebral y los resultados negativos obtenidos por la inducción directa de tumores cerebrales con MNU se realizó una segunda alternativa trasplantando células transformadas con el mismo carcinógeno<sup>102</sup> en la cisterna magna de animales adultos. Al cabo de aproximadamente un mes, los animales inyectados comenzaron a mostrar impedimentos motores progresivos que luego fueron explicados por la presencia de una masa tumoral a la altura de la médula torácica. Sin embargo, no se observó la presencia de anomalías que pudieran sugerir la presencia de tumores en el cerebro.

Aunque con este abordaje, la meta inicial de lograr el desarrollo de masas tumorales cerebrales no se cumplió, se obtuvieron dos resultados destacables. Por un lado, y en la misma línea que los trabajos de Hiraga<sup>81,82</sup> y Lazzaro<sup>102</sup>, la inyección de las células transformadas con MNU logró inducir neoplasmas en animales adultos inmunocompetentes.

El grupo de Fiebig ha reportado que la respuesta de los tumores inducidos en animales inmunodeprimidos al tratamiento con los agentes anticarcinógenos que se utilizan en oncología clínica puede llegar a mostrar un grado de correspondencia significativo con los resultados obtenidos en tumores de los pacientes<sup>126</sup>. Sin embargo, es dificultoso y discutible extrapolar los potenciales resultados en la clínica de nuevos agentes terapéuticos evaluados en modelos inmunodeprimidos donde la inmunidad de los animales y su capacidad de responder a la presencia del neoplasma están condicionadas por el modelo mismo<sup>41,42,127</sup>. Por ello, la posibilidad de emplear animales con su sistema inmune normal presenta una ventaja considerable ya que permite la interacción tumor-hospedero como ocurre en neoplasmas espontáneos.

---

<sup>126</sup> Scholz CC, Berger DP, Winterhalter BR, Henss H, Fiebig HH. *Correlation of drug response in patients and in the clonogenic assay with solid human tumour xenografts*. Eur J Cancer. 1990;26(8):901-5.

<sup>127</sup> Chen L, Zhang Y, Yang J, Hagan JP, Li M. *Vertebrate animal models of glioma: understanding the mechanisms and developing new therapies*. Biochim Biophys Acta 1836, 2013:158–165

Por otro lado, si bien la inyección icv es manual, la localización de los tumores (individuales para cada animal), a la altura de las posiciones más superiores de la médula torácica, fue similar en todos los animales que los desarrollaron. Este hallazgo no es menor, pues los datos obtenidos en distintos abordajes de carcinogénesis química directa o por modelos ectópicos, producían una variabilidad en la localización e incluso en el número de neoplasmas inducidos, sobre todo en los modelos de carcinogénesis química<sup>43,45</sup>.

### **C- INDUCCIÓN DE TUMORES CEREBRALES MEDIANTE TRASPLANTE CELULAR ORTOTÓPICO**

A pesar de que la modalidad B fue implementada con bastante éxito, con el fin de obtener un modelo en donde las condiciones fueran lo más similares a la patología humana, se implementó la modalidad C para intentar desarrollar neoplasmas cerebrales. El trasplante de células transformadas directamente en el parénquima cerebral en las adyacencias de la *substantia nigra* indujo la aparición de neoplasmas en tiempos y localizaciones similares en todos los animales que desarrollaron tumores.

Este abordaje indujo el desarrollo de tumores cerebrales únicos con características similares entre distintos animales y con un tiempo de desarrollo comparable en el 90% de los individuos. Estos resultados presentan ventajas indudables en cuanto a reproducibilidad, predictibilidad y rapidez del modelo. Esta aproximación, mostró mejores tasas de éxito y de reproducibilidad que el trasplante de células C6 que fueron empleadas como controles positivos (50% de éxito). Uno de los resultados más importantes obtenidos ha sido la identificación del lugar de inyección apropiado. El lugar seleccionado permitió el desarrollo de tumores de volumen considerable sin que se observaran síntomas que atentan contra el bienestar del animal, tal como ocurrió con los tumores generados en médula que coartaron paulatinamente la movilidad de los mismos.

Debido a que esta modalidad no sólo reúne las ventajas anteriormente enumeradas para la modalidad de trasplante ectópico, sino que aumenta la tasa de éxito y cumple el objetivo general de tener un modelo de tumorigénesis cerebral, los tumores producidos por trasplante ortotópico de células transformadas fueron los analizados para cumplir con el objetivo 2 de la tesis.

#### **Carácter infiltrante de los tumores inducidos**

Una ventaja adicional de este último modelo ha sido la reproducibilidad de aspectos relevantes para la clínica, como el carácter infiltrante de los tumores inducidos por las células transformadas, superando uno de los principales inconvenientes de los modelos de trasplante de gliomas<sup>79</sup> que usualmente fallan en este aspecto.

La infiltración difusa de las células tumorales en todo el cerebro es una característica de los astrocitomas de alto grado como el GBM<sup>17,128</sup>. En los casos más severos, la infiltración microscópica del tumor involucra grandes porciones del cerebro, expandiéndose bilateralmente a través de ambos hemisferios<sup>129</sup>. Por el

---

<sup>128</sup> Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, Brennan C, Chin L, DePinho RA, Cavenee WK. *Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment*. Genes Dev. 2007 Nov 1;21(21):2683-710.

<sup>129</sup> DeAngelis LM. *Brain tumors*. N Engl J Med. 2001 Jan 11;344(2):114-23.

contrario, tanto los gliomas de bajo grado como las metástasis originarias de tejidos no neurales tienden a expandirse de forma discreta, generando una lesión no invasiva. En los modelos de trasplante ortotópico realizados con células transformadas y con células C6 se observaron ambos comportamientos. Las células C6 se desarrollaron en masas tumorales circunscritas parcial o totalmente. La invasión, cuando estaba presente, se manifestaba como grupos grandes infiltrantes de células y no como infiltración celular individual, por lo que se observó principalmente un desplazamiento en masa del tejido hospedador producido por crecimiento de la masa tumoral. Este crecimiento fue acompañado además por una pequeña zona de edema circundante y marcada necrosis central, lo que es usualmente observado en los modelos clásicos de trasplante celular<sup>45,79</sup>. En cambio, los implantes de células transformadas mostraron un carácter claramente infiltrante a nivel microscópico, recreando de mejor manera la histopatología de los gliomas humanos<sup>17,45,79</sup>. No obstante, cabe aclarar que la invasión individual de células no pudo ser corroborada con las herramientas disponibles. Sin embargo, la tinción con azul de metileno permitió determinar que las células migrantes desde la masa tumoral primaria lo hacen al menos en grupos pequeños. Si bien los determinantes biológicos de esos dos comportamientos no están claros, pareciera que la interacción entre las células tumorales con el microambiente puede tanto facilitar como imposibilitar la invasión<sup>130,131</sup>. La matriz extracelular tumoral está físicamente posicionada en la unión entre el tumor y su microambiente, y como tal, puede estar en un lugar privilegiado para actuar como regulador crítico entre ambas partes.

Clásicamente, los astrocitos reactivos han sido asociados a un rol pro-invasivo en el microambiente tumoral, fomentando la dispersión de las células del glioma en el cerebro a través de la proteólisis de la matriz que inicialmente juega un rol inhibitorio<sup>132</sup> o por la secreción de factores de crecimiento específicos<sup>130</sup>. Sin embargo, evidencia reciente indica que los astrocitos en el microambiente tumoral pueden tener funciones contradictorias<sup>83</sup>. Con respecto a este punto, la inmunoreactividad para GFAP analizada para los tumores inducidos por las células transformadas y por las células C6, permiten apreciar dos modos de respuesta de los astrocitos a los tumores inducidos. En los tumores no invasivos como los inducidos por las células C6, los astrocitos están dispuestos encapsulando las células trasplantadas, por lo que podrían estar contribuyendo al fenotipo no invasivo restringiendo la infiltración de las células tumorales, formando un tipo de cicatriz que funciona como barrera previniendo una mayor propagación del daño tisular tal como sucede

---

<sup>130</sup> Edwards LA, Woolard K, Son MJ, Li A, Lee J, Ene C, Mantey SA, Maric D, Song H, Belova G, Jensen RT, Zhang W, Fine HA. *Effect of brain- and tumor-derived connective tissue growth factor on glioma invasion*. J Natl Cancer Inst. 2011 Aug 3;103(15):1162-78.

<sup>131</sup> Markovic DS, Vinnakota K, Chirasani S, Synowitz M, Raguet H, Stock K, Sliwa M, Lehmann S, Kälin R, van Rooijen N, Holmbeck K, Heppner FL, Kiwit J, Matyash V, Lehnardt S, Kaminska B, Glass R, Kettenmann H. *Gliomas induce and exploit microglial MT1-MMP expression for tumor expansion*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Jul 28;106(30):12530-5

<sup>132</sup> Le DM, Besson A, Fogg DK, Choi KS, Waisman DM, Goodyer CG, Rewcastle B, Yong VW. *Exploitation of astrocytes by glioma cells to facilitate invasiveness: a mechanism involving matrix metalloproteinase-2 and the urokinase-type plasminogen activator-plasmin cascade*. J Neurosci. 2003 May 15;23(10):4034-43.

en una lesión traumática<sup>133</sup>. En contraste, en los tumores inducidos por células transformadas los astrocitos dispersos en el tumor, que interpretamos pertenecen al hospedador, no formaron una barrera y podrían estar contribuyendo al avance del tumor dentro del parénquima tal como reportaban las visiones más tradicionales<sup>130,132</sup>.

### **Atipia nuclear**

Los tumores inducidos por células transformadas presentaron una alta frecuencia de núcleos atípicos y la presencia de mitosis en diferentes estadios. La atipia nuclear, característica de gliomas de grado II y superior, es un rasgo que hace referencia a la apariencia inusual de los núcleos de las células tumorales. Los núcleos de las células que presentan este rasgo son pleomórficos, variables en tamaño y forma. Usualmente la relación de tamaño núcleo:citoplasma está comprendida entre 1:4 y 1:6, pero en las células con núcleos atípicos esta relación puede llegar a ser 1:1<sup>134</sup>. En gliomas de alto grado además es posible encontrar un número grande de figuras mitóticas que son reflejo de la intensa actividad proliferativa de las células tumorales. La visualización de más de una célula mitótica en 10 campos del microscopio ha llegado incluso a correlacionarse con una disminución en la media de supervivencia de 5.5 años a 1 año en pacientes con gliomas malignos<sup>135</sup>.

### **Alteraciones vasculares**

Los tumores inducidos por células C6 mostraron alteraciones vasculares relacionadas fundamentalmente con el calibre aumentado mientras que los producidos por administración de las células transformadas presentaron vasos glomeruloides. Se reporta que estos vasos se forman por el empaquetamiento de células endoteliales que se dividen activamente pero, no alcanzan a organizarse de manera correcta. Están asociados además con los gliomas de más alto grado<sup>136</sup>. La proliferación de células del endotelio vascular es un rasgo común entre los cánceres agresivos y usualmente están asociados a un pronóstico poco alentador. La observación de proliferación del endotelio vascular en cortes histológicos ha sido relacionada con un descenso de 3.5 años de la supervivencia esperable en pacientes con gliomas de alto grado<sup>135</sup>.

### **Expresión de marcadores de células madre tumorales y progenitores**

Se ha observado expresión de CD133 en las porciones más externas de los tumores inducidos por células transformadas y por células C6. CD133 es considerado un marcador de células madre desde que en 2003 se aisló una subpoblación celular CD133 de tumores humanos que exhibió propiedades de proliferación,

---

<sup>133</sup> Myer DJ, Gurkoff GG, Lee SM, Hovda DA, Sofroniew MV. *Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury*. Brain. 2006 Oct;129(Pt 10):2761-72.

<sup>134</sup> Parpura V, Verkhratsky A. *Pathological Potential of Neuroglia*. Springer. Publicado on-line 2014

<sup>135</sup> Fulling KH, Garcia DM. Anaplastic astrocytoma of the adult cerebrum. Cancer. 1985 55: 928-931 82.

<sup>136</sup> Jain RK, di Tomaso E, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG, Batchelor TT. *Angiogenesis in brain tumours*. Nat Rev Neurosci. 2007 Aug;8(8):610-22.

auto-renovación y dediferenciación, todas asociadas a células madre<sup>137</sup>. Además, estas células mostraron su capacidad para recapitular el tumor original cuando una cantidad tan pequeña como 100 células se inyectaron en cerebros de ratones<sup>137</sup>.

En los modelos que fueron trabajados, la tinción más fuerte de CD133 se encontró en los bordes de los tumores, en las regiones fronterizas donde putativamente se encuentran las células tumorales invasivas y más agresivas. Las células del borde en los tumores inducidos por células transformadas también fueron positivas a nestina, un marcador de células indiferenciadas. Estas células con dichos perfiles, que se localizan usualmente en los bordes, se correlacionan con un patrón de expresión génica que sugiere funciones de remodelación del nicho tumoral, vitales para el mantenimiento y progresión del tumor<sup>138</sup>.

La nestina es una proteína de filamento intermedio predominantemente expresada en precursores neurogénicos y miogénicos<sup>139</sup>, fundamentalmente en estadios tempranos del desarrollo. Durante el neurodesarrollo del SNC, la expresión de nestina disminuye gradualmente y es reemplazada en los progenitores gliales por GFAP a medida que se diferencian en astrocitos<sup>140,141</sup>. Durante la adultez, la nestina permanece restringida a los nichos neurogénicos y se re-expresa solamente en condiciones patológicas asociada a un proceso de reactividad astrocitaria que involucra proliferación<sup>142</sup>. En el contexto de un glioma, la presencia de nestina en las poblaciones celulares es reflejo del proceso de dediferenciación hacia un estado indiferenciado que sufren las células tras adquirir una lesión genética. Por lo tanto, la nestina se utiliza como marcador de astrocitomas por lo general de alto grado<sup>143</sup>.

La alta expresión del factor de transcripción Olig2 en el núcleo de las células transformadas es otro resultado relevante desde el punto de vista clínico, ya que la presencia de este marcador está relacionada con un subtipo difuso desde el punto de vista histológico y con un peor pronóstico de acuerdo a los datos

---

<sup>137</sup> Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. *Identification of a cancer stem cell in human brain tumors*. Cancer Res. 2003 Sep 15;63(18):5821-8.

<sup>138</sup> Friedmann-Morvinski D, Bhargava V, Gupta S, Verma IM, Subramaniam S. *Identification of therapeutic targets for glioblastoma by network analysis*. Oncogene. 2016 Feb 4;35(5):608-20.

<sup>139</sup> Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. *CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein*. Cell. 1990 Feb 23;60(4):585-95.

<sup>140</sup> Hockfield S, McKay RD. *Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system*. J Neurosci. 1985 Dec;5(12):3310-28.

<sup>141</sup> Sancho-Tello M, Vallés S, Montoliu C, Renau-Piqueras J, Guerri C. *Developmental pattern of GFAP and vimentin gene expression in rat brain and in radial glial cultures*. Glia. 1995 Oct;15(2):157-66.

<sup>142</sup> Frisén J, Johansson CB, Török C, Risling M, Lendahl U. *Rapid, widespread, and longlasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury*. J Cell Biol. 1995 Oct;131(2):453-64.

<sup>143</sup> Yang HY, Lieska N, Shao D, Kriho V, Pappas GD. *Proteins of the intermediate filament cytoskeleton as markers for astrocytes and human astrocytomas*. Mol Chem Neuropathol. 1994 Feb-Apr;21(2-3):155-76.

obtenidos en investigación clínica<sup>144</sup>. Refuerza asimismo, la naturaleza glial del tumor inducido, ya que Olig2 es expresado por progenitores gliales que en el SNC originan astrocitos y oligodendrocitos<sup>145</sup>.

### Análisis de PET

Los resultados del estudio piloto de los tumores inducidos por células transformadas en el micro-PET del CUDIM indicaron buena captación de <sup>11</sup>C-MET y <sup>18</sup>F-FDG. Los resultados con metionina eran esperables dado su uso preferido en el campo de la imagenología neuro-oncológica debido al mejor contraste que proporciona<sup>28</sup>. Sin embargo, los resultados más prometedores surgieron del empleo de <sup>18</sup>F-FDG que proporcionó un buen contraste y localización del tumor a pesar del alto metabolismo basal de glucosa del tejido nervioso. Al respecto, hay reportes que muestran que el uso de <sup>18</sup>F-FDG solo logra ser eficiente y conclusa en casos de glioma avanzados<sup>146,147</sup>. En ambos casos, se obtuvieron buenas relaciones entre las señales tumor/contralateral determinadas para ambos radiofármacos, concordando con los valores esperados de un buen agente de contraste en cerebro<sup>148,149</sup>. Sin embargo, estas observaciones deben interpretarse en el marco de un estudio piloto y un número mayor de animales es necesario para obtener evidencia científica que validez los datos obtenidos.

Los tumores cerebrales humanos son conocidos por su alta heterogeneidad producida por la coexistencia de muchas poblaciones celulares con diferente capacidad proliferativa y diferenciación<sup>96</sup>. Esta heterogeneidad celular se ha observado en los tumores infiltrantes inducidos por células transformadas tanto en la morfología como en los estadios del ciclo celular. La presencia de atipia nuclear significativa, junto con la de vasos glomeruloides típicos indicadores de proliferación endotelial exacerbada, además de la marcación positiva para la expresión de nestina y CD133, nos indican que los tumores desarrollados poseen características de gliomas humanos y parecen corresponderse con tumores con comportamiento más agresivo y con una gradación mayor según la escala de la OMS<sup>98</sup>.

Comparando entonces los modelos realizados, los tumores de células transformadas inducidos por trasplante ortotópico, si bien no muestran zonas necróticas, recapitulan rasgos histopatológicos de los

---

<sup>144</sup> Ligon KL, Alberta JA, Kho AT, Weiss J, Kwaan MR, Nutt CL, Louis DN, Stiles CD, Rowitch DH. *The oligodendroglial lineage marker OLIG2 is universally expressed in diffuse gliomas*. J Neuropathol Exp Neurol. 2004 May;63(5):499-509.

<sup>145</sup> Xian H, Gottlieb DI. *Dividing Olig2-expressing progenitor cells derived from ES cells*. Glia. 2004 Jul;47(1):88-101.

<sup>146</sup> Wong TZ, van der Westhuizen GJ, Coleman RE. *Positron emission tomography imaging of brain tumors*. Neuroimaging clinics of North America. 2002; 12(4):615-26.

<sup>147</sup> Strauss LG. *Fluorine-18 deoxyglucose and false-positive results: a major problem in the diagnostics of oncological patients*. European journal of nuclear medicine. 1996; 23(10):1409-15.

<sup>148</sup> Nedergaard MK, Michaelsen SR, Urup T, Broholm H, El Ali H, Poulsen HS, Stockhausen MT, Kjaer A, Lassen U. *<sup>18</sup>F-FET microPET and microMRI for anti-VEGF and anti-PIGF response assessment in an orthotopic murine model of human glioblastoma*. PLoS One. 2015 Feb 13;10(2):e0115315.

<sup>149</sup> Fu Y, Ong LC, Ranganath SH, Zheng L, Kee I, Zhan W, Yu S, Chow PK, Wang CH. *A Dual Tracer <sup>18</sup>F-FCH/<sup>18</sup>F-FDG PET Imaging of an Orthotopic Brain Tumor Xenograft Model*. PLoS One. 2016 Feb 4;11(2):e0148123

gliomas humanos de alto grado que no son mostrados por los tumores inducidos por trasplante de la línea C6, que exhibieron zonas necróticas pero no son infiltrantes, no mostraron angiogénesis típica ni atipias nucleares ni altas tasas mitóticas.

**En suma, del trabajo de tesis podemos concluir que:**

- La inyección de MNU en la cisterna magna de ratas neonatales no indujo gliomas al cabo de cuatro meses.
- Las células transformadas con MNU produjeron la aparición de neoplasias al ser inyectadas en hospederos inmunocompetentes.

La administración icv generó tumores en médula espinal en el 75% de los animales inyectados, mientras que la vía intracerebral mediante cirugía estereotáxica presentó un porcentaje de éxito que supera el 90%.

- Los tumores de células transformadas recrean varios rasgos histopatológicos observados en gliomas humanos de alto grado.

El carácter infiltrante, atipias nucleares y alta tasa mitótica, proliferación endotelial evidenciada por la presencia de vasos glomeruloides y expresión de marcadores de célula madre tumoral asociados a gliomas agresivos de mal pronóstico, son las características que consideramos más destacables al momento de la comparación del modelo desarrollado con los gliomas humanos. En cambio, los tumores inducidos por células C6 si bien presentaron zonas necróticas típicas de los gliomas humanos de alto grado no presentaron angiogénesis típica, atipias nucleares o carácter infiltrante.

- El modelo de trasplante ortotópico de células transformadas presentó una buena captación de los radiofármacos más utilizados en clínica.

El análisis funcional mediante PET permitió observar la captación mayor en el cerebro en las zonas donde se encontraban los tumores inducidos por células transformadas, sugiriendo su uso factible en investigación biomédica.

Por lo tanto, en esta tesis se corroboró la hipótesis inicial, logrando inducir, mediante trasplante de células transformadas en nuestro laboratorio, tumores en el SNC en animales inmunocompetentes cuya caracterización morfológica inicial sugiere que son gliomas de alto grado, ofreciendo este nuevo modelo ventajas significativas sobre los utilizados tradicionalmente. Los resultados positivos de la prueba piloto de PET son alentadores en cuanto a que podría convertirse en una herramienta para la investigación en gliomas.

## PERSPECTIVAS

Dado el cuerpo de resultados obtenidos en los tumores inducidos por células transformadas, luego de concluir que ofrece ventajas comparativas respecto de los modelos disponibles. Entre los aspectos a desarrollar se encuentran:

- Realizar la caracterización a nivel celular y molecular de los tumores inducidos por células transformadas. Los datos obtenidos contribuirán al conocimiento de la biología de los gliomas y proporcionará información útil para la investigación biomédica y la clínica.
- Analizar una muestra de tamaño suficiente para determinar la significación estadística de los valores obtenidos mediante PET a tiempo final. Correlacionar los datos morfológicos con los funcionales para aportar datos sobre el comportamiento y evolución del tumor.
- Analizar la señalización dependiente del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en los tumores inducidos por células transformadas ya que si bien la angiogénesis tumoral se asocia generalmente a la liberación de VEGF por las células tumorales y a la hipoxia del ambiente tumoral<sup>150</sup>, dicha vía pierde relevancia en un contexto de la resistencia a la terapia antiangiogénica de algunos tipos de cáncer, donde la angiogénesis tumoral se produce en parte por la transdiferenciación de células madre tumorales y no por proliferación de las células endoteliales VEGF-dependiente<sup>151</sup>.
- Estudiar las vías dependientes de Olig2 y correlacionar su expresión con la evolución de los tumores inducidos. Los gliomas de alto grado son notoriamente insensibles a la radiación y a los fármacos genotóxicos, en parte debido a la expresión de Olig2 que antagoniza la función de p53<sup>152</sup>. Además la expresión de Olig2 se asocia a mayor capacidad infiltrante y peor pronóstico<sup>99</sup>.
- Evaluar el curso temporal del desarrollo del tumor desde la inyección de las células hasta la fecha de procesamiento, a nivel morfológico y funcional mediante PET. Correlacionar los datos morfológicos con los funcionales para evaluar el posible uso del modelo como herramienta para la gradación de tumores, lo que es relevante y aún no es materia consensuada en la clínica.
- Extender el análisis de PET a otros radiofármacos de uso conocido y de radiofármacos nuevos donde la correlación con modelos en animales inmunodeprimidos condiciona la respuesta del hospedador.

---

<sup>150</sup> Plate KH1, Breier G, Weich HA, Risau W. *Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo*. Nature. 1992 Oct 29;359(6398):845-8.

<sup>151</sup> Soda Y, Marumoto T, Friedmann-Morvinski D, Soda M, Liu F, Michiue H, Pastorino S, Yang M, Hoffman RM, Kesari S, Verma IM. *Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Mar 15;108(11):4274-80.

<sup>152</sup> Mehta S, Huillard E, Kesari S, Maire CL, Golebiowski D, Harrington EP, Alberta JA, Kane MF, Theisen M, Ligon KL, Rowitch DH, Stiles CD. *The central nervous system-restricted transcription factor Olig2 opposes p53 responses to genotoxic damage in neural progenitors and malignant glioma*. Cancer Cell. 2011 Mar 8;19(3):359-71.