



DESARROLLO DE UN MODELO MURINO DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME

Tutor: Eduardo Fernández Jover
Co-tutoras: Elisa Checa Chavarría
Cristina Soto Sanchez
Instituto de Bioingeniería
Departamento de Biología celular
Área de neuroprótesis y rehabilitación visual



Adrián Guerrero Moreno
Grado en Biotecnología
Facultad de Ciencias Experimentales
2015-2016

Índice

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1 PROCEDIMIENTOS <i>IN VITRO</i>	12
3.2 PROCEDIMIENTOS <i>IN VIVO</i>	17
3.3. HISTOLOGÍA	21
4. RESULTADOS	24
4.1 RESULTADOS <i>IN VITRO</i>	24
4.2 RESULTADOS <i>IN VIVO</i>	30
4.3 RESULTADOS DEL ANÁLISIS HISTOLÓGICO	31
5. DISCUSIÓN	38
6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA	40
7. BIBLIOGRAFÍA	41



RESUMEN

El cáncer es la segunda causa de muerte en los países desarrollados según la Organización Mundial de la salud (OMS), en concreto, afecta a uno de cada tres individuos a lo largo de su vida, provocando la muerte a una de cada cinco personas. El tumor cerebral más común en adultos, el Glioblastoma Multiforme (GBM), es además uno de los tumores más agresivos ya que, a pesar de los tratamientos actuales solo confiere entre 12 y 15 meses de vida tras su inicio a la mayoría de los pacientes. Debido a esta gravedad se justifica este trabajo en el cual se ha elaborado un modelo en rata del GBM que reproduce los rasgos moleculares del tumor por lo que permitirá la validación de nuevos tratamientos contra la enfermedad. Las células tumorales en el interior del animal fueron marcadas con una molécula fluorescente mediante unas condiciones que fueron previamente estudiadas *in vitro* con el objetivo de optimizar sus parámetros fluorescentes. Además el tumor fue analizado inmunohistoquímicamente y determinado su tamaño en dos tiempos de desarrollo diferentes.

Cancer is the second leading cause of death in developed countries According to the World Health Organization (WHO), concretely, it affects one out of three individuals throughout their lives, resulting in the death of one in every five. The most common brain tumor in adults, Glioblastoma Multiforme (GBM), is also one of the most aggressive since, despite current treatments, life expectancy for most patients is between 12 and 15 months. It's due to its gravity that this work exists. In it, a rat model for GBM which reproduces the molecular features of the tumour is developed, which will allow the validation of new treatments against this disease. Tumor cells inside the animal were labeled with a fluorescent molecule by conditions which were previously studied *in vitro* in order to optimize their fluorescent paramenters. In addition, the tumour was analyzed immunohistochemically and its size determined in two diferent developmental times.

Palabras clave: Cáncer, Glioblastoma, Modelo, Rata, DiD

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es la causa de la muerte de la mayoría de los habitantes de países desarrollados después de las enfermedades cardiovasculares según la Organización Mundial de la Salud (OMS). En concreto, afecta a uno de cada tres individuos a lo largo de su vida, provocando la muerte a una de cada cinco personas [1]. La enfermedad se desarrolla debido a la mitosis desregulada de células adultas o troncales asociada a cambios genéticos, proteómicos y metabolómicos. Estos cambios dan como principal resultado un aumento en el número, tamaño, ciclo celular y metabolismo de estas células.

El proceso se inicia a partir de una célula normal que se transforma en neoplásica, que constituye la célula tumoral, por un proceso conocido como transformación maligna. El inicio suele ser una alteración mutagénica no reparada del ADN. Sin embargo, la carcinogénesis, es decir, el desarrollo de un tumor maligno, requiere varias transformaciones genéticas que reducen cada vez más la capacidad de respuesta de las células al mecanismo normal regulador del organismo. Este conjunto de alteraciones determina que las células proliferen descontroladamente formando tumores e invadan tejidos normales [1].

Los genes que participan en la carcinogénesis son aquellos cuyos productos proteicos están implicados en la progresión del ciclo celular, la reparación de daños en el ADN, la adherencia entre células vecinas y la capacidad de migración, entre otras funciones [1].

1.1 GLIOBLASTOMA MULTIFORME

El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor cerebral primario maligno más común en adultos constituyendo el 78% de los tumores del sistema nervioso central. La incidencia de este tumor es de 3 casos por cada 100.000 personas al año [2,3]. Se trata de uno de los tumores más agresivos ya que, a pesar de los avances y con las combinaciones de los distintos tipos de terapia, la mayoría de los pacientes mueren a consecuencia de la enfermedad, generalmente entre los 12 y 15 meses tras su inicio [4, 5, 6]. Son frecuentes complicaciones como eventos tromboembólicos y convulsiones [4]. Los GBMs están asociados con altas tasas de recurrencia secundaria inherente a su resistencia a la quimioterapia y radioterapia [7,8,9]. Debido a esta gran incidencia, es necesario el desarrollo de nuevos fármacos y terapias que para ser testados requieren, entre otras cosas, de modelos animales que reproduzcan las características de la enfermedad.

1.1.2 Epidemiología

El glioblastoma representa aproximadamente el 50% de todas las neoplasias procedentes de las células gliales denominadas gliomas. La incidencia anual es de 3 a 5 nuevos casos diagnosticados por cada 100.000 habitantes. A pesar de que el glioblastoma ocurre más frecuentemente en personas

alrededor de los 64 años, puede presentarse a cualquier edad, aunque es raro en niños. En los pacientes más jóvenes, de una edad media de 45 años, es más frecuente el glioblastoma secundario. Hay una leve preponderancia de la enfermedad en hombres sobre mujeres [3,5].

1.1.3 Definición y presentación clínica

El GBM se desarrolla a partir de astrocitos y está clasificado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un astrocitoma grado IV, el grado más alto y agresivo [2,6]. El término *multiforme* se refiere a la heterogeneidad de su apariencia macroscópica [6]. Se puede distinguir entre glioblastoma primario y secundario. El glioblastoma primario constituye el más común presentándose en el 90% de los casos y se desarrolla *de novo* sin presencia de una lesión maligna precursora dando lugar a un desarrollo muy rápido de solo unos pocos días o semanas. Por otro lado, el glioblastoma secundario es aquel que progresa desde un astrocitoma de menor grado hasta el GBM de grado IV. Ambos tipos de glioblastomas son molecularmente distintos, pero iguales histológicamente [4,10].

La presentación clínica es muy variable y depende principalmente de la localización y el tamaño del tumor. Los síntomas más comunes incluyen signos neurológicos, cambios de humor y personalidad y convulsiones. Debido al tamaño del tumor o la inflamación que este conlleva, puede producirse un aumento en la presión intracraneal por el aumento de la presión en el líquido cefalorraquídeo dando lugar a síntomas como náuseas, vómitos o dolor de cabeza [4,5].

1.1.4 Etiología

La etiología del glioblastoma es desconocida en la mayoría de los casos. Sin embargo, se han establecido algunos factores de riesgo como la predisposición genética, exposición a radiación ionizante, o factores ambientales como la exposición al cloruro de vinilo [11,12]. En relación a la predisposición genética por la cual otros familiares se ven afectados con tumores cerebrales primarios, solo se ha podido establecer en menos del 5% de todos los casos de glioblastoma [4,5]. En estudios de asociación a genoma completo (GWAS, *genome wide association studies*) se han identificado siete variantes genómicas que confieren un incremento del riesgo de glioma. Estas variantes se encuentran en la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT, *telomerase reverse transcriptase*), el receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) o la proteína p53, entre otros [13], de acuerdo con su implicación en el control del ciclo celular.

1.1.5 Pronóstico y estratificación del riesgo en pacientes

En los pacientes tratados con la quimioterapia estándar actual, el tiempo medio sin progresión del tumor es de 7 meses, mientras que el de supervivencia del paciente, como se introdujo anteriormente, es solo de entre 12 y 15 meses [4,5,6]. Los pacientes con la combinación más favorable

de factores pronósticos que reciben radio y quimioterapia tienen porcentajes de supervivencia del 40% a los 2 años y del 30% a los 5 años [4].

Algunos factores importantes para el pronóstico clínico son la edad del paciente, su estado mental, el índice de Karnofsky postoperatorio que mide la capacidad del paciente de realizar tareas rutinarias [14], las puntuaciones de rendimiento de la OMS que se consiguen a partir de una serie de cuestionarios que miden el estado de salud y discapacidad del paciente [15], y el grado de resección neuroquirúrgica del tumor que es establecido por los cirujanos tras la operación [16].

De este modo, tendrá gran trascendencia cualquier terapia o fármaco que mejore la esperanza o calidad de vida de los pacientes, siendo necesario, como se indicó anteriormente, el desarrollo de modelos animales de la enfermedad, entre otros, para poder testar su eficacia.

1.1.6 Rasgos histológicos

El glioblastoma se desarrolla como una neoplasia o crecimiento anormal maligno del tejido que crece difusamente con rasgos histológicos característicos como proliferación microvascular y necrosis tal y como se puede observar en la **Figura 1**.

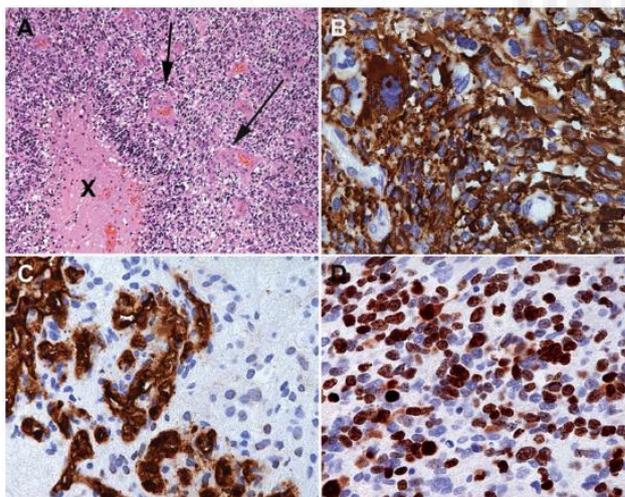


Figura 1. Neuropatología del glioblastoma. (A) Histopatología de un caso de GBM mostrando el tejido tumoral con necrosis central (x) (tinción hematoxilina y eosina). (B) Inmunotinción para el marcador astrogial Proteína ácida fibrilar glial muestra una fuerte intensidad en las células tumorales (señal marrón). (C) Inmunotinción para el marcador endotelial CD34 que muestra proliferación microvascular (marrón). (D) Inmunotinción para el antígeno Ki67 relacionado con el ciclo celular que muestra que muchas células tumorales presentan mitosis (señal marrón) [Fuente 4].

1.1.7. Patogénesis y progresión

La patogénesis del GBM es compleja debido a que el genoma tumoral posee una alta desregulación con eliminaciones puntuales de genes supresores de tumores, amplificaciones, y sobreexpresión de oncogenes, que están involucrados en una red de vías de señalización [4]. La célula es capaz, por medio de esta red, de recibir, procesar y dar respuesta a señales procedentes de su entorno. Las características del GBM se derivan de la activación de estas vías, que dan lugar a procesos tumorales como la proliferación descontrolada, inhibición de la apoptosis y senescencia, la migración e invasión y la angiogénesis [4,6]. Estos dos últimos aspectos solo es posible tenerlos en cuenta en el

desarrollo preclínico de nuevas terapias a través del desarrollo de modelos animales, en contraposición con los estudios *in vitro*, que no son capaces de abordarlos.

En condiciones normales, la progresión del ciclo celular normal está bajo estricto control. Sin embargo, en el desarrollo del GBM se dan una serie de eventos que afectan a las vías que controlan este proceso y que van convirtiendo progresivamente a la célula en maligna.

El primer evento en la patogénesis del glioblastoma es la pérdida de dicho control, adquiriendo una ventaja proliferativa sobre las células sanas. El punto de control del ciclo celular más importante en el proceso de tumorigénesis es la transición de fase G1 a S. La vía p16^{INK4a}/quinasa dependiente de ciclina (CDK)-4 / RB (retinoblastoma) 1, es una de las principales vías que afectan a este punto de control e implica p16, CDK-4, la ciclina D1, y RB1. El complejo CDK/ciclina D1 CDK fosforila RB1, induciendo de este modo la liberación del factor de transcripción E2F que activa los genes implicados en la transición G1 a S, tal como muestra la **Figura 2** [17]. Las alteraciones de al menos un componente de esta vía se producen la gran mayoría de GBMs [9].

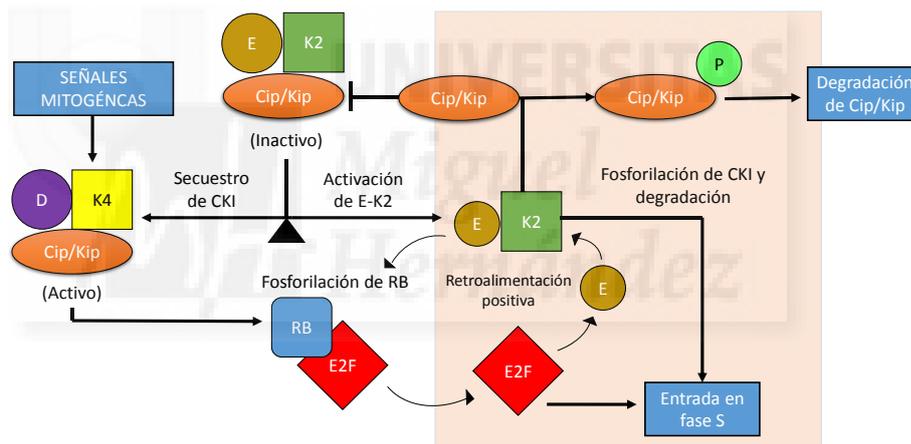


Figura 2. Regulación de la transición de fase G1 a S. Las señales mitogénicas, promueven el acoplamiento de la Ciclina D dependiente de quinasas activa que contiene CDK4 (o CDK6; no representado) y una proteína Cip o Kip. El secuestro de las proteínas Cip/Kip (CKI) disminuye el umbral de inhibición y facilita la activación del complejo Ciclina E-CDK2. La Ciclina D y E dependiente de quinasas contribuye secuencialmente a la fosforilación de Rb, suprimiendo su habilidad de reprimir los miembros de la familia E2F y activando los genes requeridos para la entrada en fase S. Estos genes, incluyen las ciclinas E y A, además de un grupo de productos génicos que regulan, por sí mismos, el metabolismo de los nucleótidos y la síntesis de ADN. El complejo Ciclina E-CDK2 antagoniza p27 por medio de su fosforilación y activando su proteólisis. La degradación de las proteínas Cip/Kip y la inducción de las ciclinas por E2F (destacado por recuadro) contribuye al desarrollo de la vía de forma independiente a la acción del mitógeno y a la irreversibilidad de la transición a la fase S [17].

El segundo evento en el desarrollo de este tumor es la sobreexpresión de factores de crecimiento y sus receptores. Una gran variedad de factores de crecimiento como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, *Epidermal Growth Factor receptor*), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, *Platelet Derived Growth Factor*), factor básico de crecimiento de fibroblastos

(bFGF, *basic Fibroblast Growth Factor*, FGF-2, *Fibroblast Growth Factor-2*), factor de crecimiento transformante o factor de crecimiento tumoral (TGF, *transforming growth factor*)- α y factor de crecimiento similar a la insulina (IGF, *insulin-like growth factor*)-1 se sobreexpresan en el GBM y proporcionan una ventaja en el crecimiento a las células neoplásicas. Generalmente, las células de glioma expresan tanto los ligandos del factor de crecimiento como sus receptores, creando un bucle autocrino de retroalimentación del crecimiento. EGFR es un receptor transmembrana responsable de detectar ligandos extracelulares, tales como EGF y TGF- α , iniciando la transducción de la señal de proliferación [6, 17].

1.1.8 Hipoxia, angiogénesis e invasión

La hipoxia juega un papel muy importante en la patología del glioblastoma cuyo mediador clave es el factor de transcripción *factor 1 inducible por hipoxia* (HIF-1) que está estabilizado bajo hipoxia. Aunque la hipoxia puede inducir muerte celular, la exposición crónica o repetida a ella puede iniciar cambios metabólicos adaptativos y seleccionar alteraciones genéticas que permiten supervivencia y proliferación celular en un ambiente hipóxico [18]. Los cambios fisiológicos inducidos por hipoxia incluyen regulación de la ruta glicolítica, formación de vasos sanguíneos, e inducción de genes codificantes de moléculas quimiotácticas como ligando 2 de quimiocina, interleucina 8, y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*) [19]. Todos estos cambios inducidos por hipoxia están implicados también en la resistencia del GBM a la quimioterapia y radioterapia.

1.1.9 Técnicas de diagnóstico

Cuando el paciente presenta síntomas que hacen indicar una patología en el sistema nervioso central, como por ejemplo debilidad motora, dolor de cabeza anormal, presión intracraneal incrementada y convulsiones, la técnica diagnóstica habitualmente utilizada es la resonancia magnética (RM) que permite la localización del tumor y determinación de su tamaño tal y como se muestra en la **Figura 3**. Para facilitar la detección del tumor, es habitual utilizar agentes de contraste como el gadolinio inyectados por vía intravenosa al paciente, que evidencia la presencia de vasos sanguíneos en la imagen.

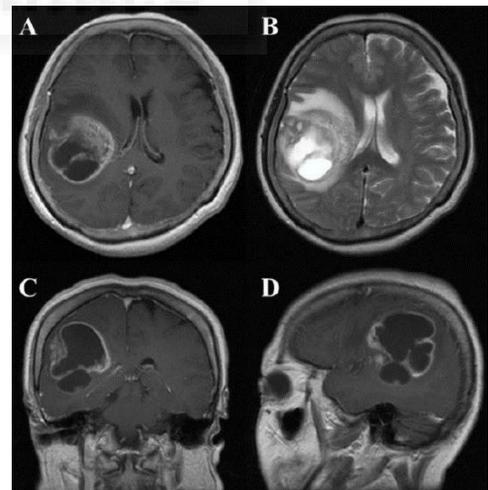


Figura 3. Pruebas radiológicas de presencia de GBM. Imagen de RM contrastada por gadolinio (A, sección axial; B, sección axial mostrando edema peritumoral; C, sección coronal; D, sección sagital). Las imágenes muestran una lesión con forma de anillo en el lóbulo parieto-temporal derecho con desplazamiento de la línea media [Fuente 6].

Además de la RM existen otras técnicas de imagen como la tomografía de emisión de positrones, la tomografía computarizada y la espectroscopia de resonancia magnética [20]. La tomografía de emisión de positrones (PET, *Positron Emission Tomography*) se basa en la utilización intravenosa de un marcador radiactivo que permite obtener información funcional del cerebro a través del registro en un detector de la distribución tridimensional que adopta dentro del organismo. Para la obtención de la información funcional, el marcador radiactivo más extendido es la fluorodesoxiglucosa, un análogo de la glucosa. Debido a esta analogía, el marcador es transportado al interior de las células por los mismos mecanismos de la glucosa, por lo que se acumulará especialmente en tejidos que desarrollen un alto consumo de este azúcar, como son los tejidos tumorales [21].

La tomografía axial computarizada, usa combinaciones procesadas de muchas imágenes obtenidas por rayos X desde diferentes ángulos para producir la sección transversal de los órganos escaneados obteniendo solamente información anatómica. La espectroscopia de resonancia magnética es una técnica que usa los niveles de ciertos metabolitos celulares como la colina, la creatina, el N-acetilaspártato, el lactato y los lípidos y para determinar la actividad tumoral [13,23].

1.1.10 Tratamiento

➤ *Neurocirugía*

La extirpación quirúrgica del tumor es el tratamiento aplicado inicialmente en la mayoría de casos para el glioblastoma debido a que puede conducir a una rápida mejora de los síntomas al reducir la presión intracraneal. Sin embargo, debido al patrón de crecimiento invasivo, las células tumorales residuales persisten a pesar de la resección macroscópicamente completa. La enfermedad es inoperable entre el 20 al 30% de los pacientes, donde solo es posible realizar una biopsia diagnóstica [4,13].

Como apoyo para la intervención quirúrgica, se utilizan técnicas de imagen como la resonancia magnética funcional (fMRI) que detecta los niveles de oxigenación en sangre como un parámetro para la localización de las áreas funcionales y sanas del cerebro. De esta manera se consigue minimizar el daño en estas zonas [13].

➤ *Radioterapia y quimioterapia*

El tratamiento estándar de los pacientes recientemente diagnosticados de glioblastoma es la radioterapia combinada con temozolomida como quimioterapéutico. Durante la radioterapia se administra radiación ionizante, la cual produce daños en el material genético de las células que las destruyéndolas en última instancia. Las células más susceptibles a esta radiación son las que están

dividiéndose activamente, como ocurre en el tejido tumoral. Aun así, se utilizan técnicas de imagen de forma paralela que localizan el tumor y que permiten focalizar la radiación en la zona apropiada, para evitar daños en los tejidos sanos [24].

Los fármacos quimioterápicos más empleados son los citostáticos o citotóxicos, denominados así por su capacidad de frenar el ciclo celular y así contribuir a la destrucción de las células. Otra denominación usada con estos fármacos es la de antineoplásicos al aplicarse con el fin de actuar contra el cáncer. Tal y como se indicó anteriormente, el proceso de división de las células tumorales se encuentra desregulado, al contrario que en las células normales. Es en este proceso donde actúan los antineoplásicos en la mayoría de los casos ya que son capaces de impedir la mitosis celular provocando la destrucción de las células tumorales. Sin embargo, los quimioterápicos pueden provocar una serie de efectos secundarios en las células sanas que se dividen constitutivamente como las de la médula ósea, el tracto digestivo y el folículo piloso provocando inmunosupresión, astenia, mucositis y alopecia, entre otros efectos.

Como se ha nombrado, la temozolomida, un agente alquilante del ADN, es el quimioterápico más extendido para el tratamiento del GBM. Se ha comprobado, que la metilación del promotor de MGMT (*O⁶-methylguanine–DNA methyltransferase*), presente en el 30 al 60% de los pacientes, favorece la acción de la temozolomida y otros agentes alquilantes. La explicación reside en que el gen MGMT codifica una proteína de reparación del ADN que elimina los grupos alquilo de la posición O⁶ de las guaninas, un sitio importante de alquilación del ADN [4,13, 25].

Otras sustancias antineoplásicas utilizadas para tratar el glioblastoma son los agentes alquilantes como la carmustina (*1,2 bis[2-chloreoethyl]-1-nitrosurea*, BCNU) y lomustina. Concretamente la carmustina se utiliza en forma de obleas biodegradables que se depositan durante la intervención quirúrgica en el lugar donde se encontraba el tumor, tras su extirpación para tratar de evitar la recurrencia tumoral. A modo de quimioterapia adyuvante, se suele utilizar el derivado de la camptotecina, irinotecan, la molécula semisintética etopósido y el compuesto basado en platino cisplatino.

Otro tratamiento aplicado, es el basado en el anticuerpo monoclonal humanizado Bevacizumab, aprobado en 2009 por la FDA americana (*Food and Drug Administration*). Este anticuerpo, se une y neutraliza la acción de VEGFR (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*), un receptor tirosinquinasa alojado en la membrana celular, habitualmente sobreexpresado en las células de GBM e implicado en angiogénesis. Este fármaco, por tanto, actúa contra la generación de nuevos vasos sanguíneos contribuyendo al bloqueo del crecimiento del tumor. El tratamiento con Bevacizumab se aplica junto con el quimioterápico irinotecan que refuerza su acción [26, 27].

Existen ensayos preliminares en fase clínica I y II que apoyan el desarrollo de antagonistas de elementos de la transducción de señales importantes en el desarrollo del GBM como EGFR, antagonistas de la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR, *mechanistic target of rapamycin*), agentes antiangiogénicos como los inhibidores de VEGF, además del ya mencionado Bevacizumab, y otros inhibidores específicos. Además, se están investigando técnicas de administración mejorada por medio de vectores dirigidos específicamente, el tratamiento contra células madre tumorales, inmunoterapia y terapia génica. Estos tratamientos experimentales y los que se utilizan actualmente se resumen en la **Tabla 1** [28].

Tabla 1: Tratamientos actuales y futuros contra el GBM.

Categorías terapéuticas		Ejemplos
Quimioterapia	Agentes alquilantes	Temozolomida Nitrosureas (carmustine, lomustine)
	Compuestos adyuvantes	Irinotecan, etopósido, cisplatino
Terapia dirigida	Anticuerpos e inhibidores contra EGFR	Erlotinib, cetuximab
	Anticuerpos contra e inhibidores contra VEGFR	Bevacizumab
	Anticuerpos e inhibidores contra PDGFR	Imatinib
Rutas intracelulares	Anticuerpos e inhibidores de RAS/RAF/MEK/MAPK	Inhibidores de farnesil transferasa (FTI)
	Inhibidores de la topoisomerasa	Camptotecina, irinotecan, etopósido.
Tratamiento contra células madre tumorales	Vectores virales	Delta-24-RGD oncolytic adenovirus
Inmunoterapia	Vacunas	Vacunas peptídicas y tumorales genéticamente modificadas
	Células dendríticas	Microglia como vector terapéutico
		Vectores virales como terapia génica para la microglía

➤ *Terapia para glioblastoma recurrente*

A pesar de la agresividad de la terapia, es muy común que los pacientes experimenten resistencia a la terapia en mayor o menor grado. Para abordarla, a algunos pacientes se les aplica nuevamente cirugía o radioterapia. Sin embargo, para la mayoría de los pacientes el tratamiento de

elección es la quimioterapia con temozolomida [29]. También se aplican otros procedimientos como la modulación de la quimioresistencia asociada a MGMT por medio de inhibidores de la MGMT como O⁶-benzilguanina [30], nitrosoureas, quimioterapia basada en platino, irinotecan, lomustina y la inhibición de la señalización mediada por VEGF por medio de Bevacizumab anteriormente explicada.

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

2.1 ANTECEDENTES

2.1.1 Modelos animales

Como ya se ha indicado anteriormente, modelizar la formación de gliomas en modelos animales es esencial para el desarrollo de nuevos tratamientos más efectivos, además de para la identificación de las vías que contribuyen a la formación del tumor, el mantenimiento de su fenotipo tumoral y el desarrollo de resistencias a las terapias.

Mientras que muchas de las rutas biológicas que caracterizan el cáncer se han estudiado *in vitro* a través de cultivo celular, es necesario recurrir a modelos animales para poder estudiar el ambiente *in vivo* del tumor. El modelo de cáncer *in vivo* permite tener en cuenta procesos como la invasión, angiogénesis, metástasis y elementos del ambiente tumoral como factores de crecimiento.

La característica más importante que otorga validez a un modelo animal de GBM es el grado de semejanza al glioma humano. Para alcanzarlo, se debe desarrollar un tumor maligno con las mismas características que el GBM, como la heterogeneidad celular, patrón de crecimiento invasivo y la inducción de generación de nuevos vasos sanguíneos. Además, debe poseer un perfil genómico, proteómico y metabolómico lo más semejante posible al del tumor real y desarrollar las interacciones con el ambiente típicas de la enfermedad como la invasividad de las células tumorales y el desarrollo de angiogénesis [31].

Existen varias aproximaciones para el desarrollo de un modelo de GBM, entre ellas, el modelo inducido químicamente, por el cual el tumor es provocado directamente en el animal por la acción de agentes alquilantes del ADN [31,32,33], el modelo modificado genéticamente a través de la utilización de ratones transgénicos que amplifican la acción de oncogenes, o bien mediante el uso de animales que han sufrido deleciones en genes supresores de tumores [31].

2.1.2 Modelos de xenoinjerto de GBM

Se trata del modelo más extendido en la investigación del cáncer y la modalidad por la que se optó en este trabajo, al imitar de forma más exacta el comportamiento del tumor. En cuanto a los modelos, existen también dos tipos:

- Heterotípico: las células tumorales se implantan en el animal en una zona diferente a la que se encuentran normalmente en la enfermedad real. El método más extendido de modelo heterotípico es en el que el tumor se implanta subcutáneamente.
- Ortotópico: las células tumorales se implantan en el lugar donde se encuentra el tumor real. Por lo tanto, en un modelo de GBM las células tumorales se deberán implantar intracranealmente.

En el modelo heterotípico, al implantarse el tumor bajo la piel, no se encuentra en el mismo ambiente que el GBM en condiciones normales, por lo tanto, no está sujeto a la acción de la barrera hematoencefálica, que aísla al SNC del riego sanguíneo y constituye una barrera selectiva frente a gran cantidad de moléculas, incluido los fármacos, dando lugar a una farmacocinética de entrega y aclaramiento diferentes a la que se da a nivel subcutáneo.

En consecuencia, en el presente trabajo se aplicó el modelo ortotópico induciendo el tumor con una línea celular de GBM de origen humano. La elección se debió a que al encontrarse el tumor en el mismo ambiente que el GBM real, es capaz de dar lugar a resultados más fácilmente extrapolables a la enfermedad humana, ya que este modelo se utilizará para testar fármacos enfocados a tratar la enfermedad [34].

Los animales utilizados mayoritariamente en el estudio de la eficacia de nuevos fármacos son los inmunodeficientes. El motivo es que al no desencadenar rechazo por parte del sistema inmunitario se mejora el bienestar del animal y se permite la inducción de un tumor mediante células humanas, además de esta manera es posible asociar directamente la disminución o falta de progresión de la masa del tumor con la actividad del fármaco, ya que el organismo del animal no actuará contra el cáncer.

Para el tratamiento del GBM, en laboratorio del Prof. Eduardo Fernández se está estudiando un fármaco antitumoral basado en la camptotecina que necesita de un modelo animal para continuar su proceso de validación. Concretamente, la camptotecina induce la apoptosis celular al interferir en la replicación de ADN al unirse al complejo que forma la Topoisomerasa I con el ADN cuando está cumpliendo su función de relajar las tensiones en la molécula que son consecuencia de su enrollamiento [35].

2.2 OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es el desarrollo de un modelo animal de glioblastoma multiforme, para su posterior utilización en un ensayo preclínico para la validación de fármacos contra esta enfermedad, como es la camptotecina. Para ello, se han de completar los siguientes objetivos específicos:

- Búsqueda bibliográfica para determinar la elección de la línea celular, la aproximación quirúrgica y duración del estudio.
- Establecer un método de marcaje celular que permita el seguimiento de las células de U87 *in vitro* e *in vivo*.
- Evaluar la formación del tumor a partir de las células implantadas y sus características para comprobar su semejanza a un GBM humano.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 PROCEDIMIENTOS IN VITRO

El tumor se desarrolló a partir de una línea celular ya establecida, en concreto, se utilizó la línea celular de origen humano U87 MG (ATCC®), procedente de un paciente de GBM. Esta línea, al desarrollarse da lugar a una masa tumoral con un patrón difuso infiltrativo. Carece de la proteína S100β y presenta la proteína p53 sin mutaciones, sin embargo, su vía PI3/Akt está sobreexpresada debido a una alta expresión de Akt [31,36]. Para poder diferenciar histológicamente las células del tumor de las del tejido sano del animal tras su implantación quirúrgica, se empleó un marcaje fluorescente sobre la línea celular.

Con el objetivo de refinar el protocolo de tinción y adecuarlo a su utilización para el desarrollo del modelo, se procedió a la tinción de dicha línea celular y se evaluó la intensidad de su marcaje y el número de células fluorescentes a lo largo del tiempo. Además estos datos permitirían desarrollar un modelo que predijera el porcentaje de células con fluorescencia y la intensidad de fluorescencia de estas como método de cuantificación del desarrollo de la línea.

La tinción consistió en la aplicación de carbocianina lipofílica DiD (Thermo Fischer) que fue elegida por las características que se explican a continuación:

- Su biocompatibilidad con las células, permitiendo su desarrollo normal a pesar del marcaje.
- Su carácter lipofílico que le confiere la capacidad de introducirse en las membranas de las celulares sin difundir al medio, por lo que en el interior del animal toda célula con fluorescencia

procedería de las células tumorales implantadas o en algunos casos de fagocitos que las hubieran internado.

- Con cada división, la cantidad de sonda fluorescente se reparte entre las células hijas, de modo que constituye una forma cualitativa de determinar el grado de crecimiento del tumor [37,38].

Para el desarrollo del protocolo de tinción fue necesario aplicar a las células un protocolo de tripsinización y de conteo celular para disponerlas a una concentración conocida.

Tabla 2: Medios de cultivos celulares utilizados durante los experimentos in vitro

Medio	Componente	Concentración	Producto comercial
Medio de U87	DMEM, <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	90%	DMEM (1X) + GlutaMAX™ Gibco® by life technologies™
	FBS, <i>Fetal Bovine Serum</i>	10%	Suero fetal bovino (FBS) Biowest
	Penicilina-estreptomicina	Diluido 1:100	Gibco® by life technologies™
Medio neutralizante	HBBS, <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>	90%	Hank's Balanced Salt Solution Gibco® by life technologies™
	<i>Fetal Bovine Serum</i> , FBS	10%	Suero fetal bovino (FBS) Biowest

3.1.2 Protocolo de tripsinización

En primer lugar, se elimina el medio celular de la placa de cultivo y se realizan dos lavados con tampón fosfato salino (PBS, *phosphate buffered saline*) (PBS Dulbecco's, Biowest). Con esto se consigue retirar los desechos celulares en disolución, conservando las células viables que se encuentran en monocapa en la placa. A continuación, se tripsinizan las células con tripsina al 0,05% (Gibco® by life technologies™) y se incuban a 37°C de temperatura con 5% de CO₂ entre 3 y 5 minutos. Por medio de la adición de esta proteasa, se digieren las proteínas de unión intercelular que mantienen unidas las células entre sí y a la placa. De este modo, se logra disgregar y separar las células de la placa para ponerlas en suspensión. Seguidamente, se procede a la neutralización de la actividad de la tripsina por la adición de medio neutralizante (véase composición del Medio Neutralizante en la **Tabla 2**). Las proteínas del suero sirven de sustrato para la tripsina saturándola y desplazando su acción sobre las proteínas de las células.

3.1.3 Protocolo de contaje celular

Tras aplicar el protocolo de tripsinización, se toma una muestra para la posterior contabilización de células y el resto de células se centrifugan a 1740 rpm durante 5 minutos. El contaje de células se realiza en cámara de Neubauer mediante el colorante Azul Tripán 0,4% en una proporción 1:1 con la muestra, encontrándose el tinte al 0,2% en la mezcla final. Esta tinción, permite diferenciar las células vivas de las muertas, ya que no se internaliza en las células vivas mientras que en las muertas penetra fácilmente debido a la falta de integridad en su membrana celular. De este modo, las células teñidas de azul se corresponderían con no viables y el resto con las viables. El recuento de las células se realizó con microscopio invertido modelo Olympus IX51 en campo claro. Seguidamente, se procedió a la eliminación del sobrenadante de las células centrifugadas y se resuspendieron en medio de cultivo de U87 (Ver composición en **Tabla 2**).

3.1.4 Protocolo de marcaje celular

El siguiente paso fue la realización del marcaje con las carbocianina DiD (estructura molecular en **Figura 4**) de modo que en la disolución final se encontraran en una concentración de 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$. La absorción máxima de este compuesto se da a 644 nm de longitud de onda y emisión máxima a 665 nm de longitud de onda, correspondiente al rojo. Una vez añadido el tinte, se estudiaron 3 condiciones experimentales en las cuales se incubaron las células durante 5, 10 o 15 minutos con el objetivo de testar la mejora en los parámetros fluorescentes de proporción de células fluorescentes e intensidad de fluorescencia, al aumentar el tiempo de contacto entre las células y la carbocianina en disolución. Pasado este tiempo, se añadió PBS en un volumen aproximadamente 10 veces superior al utilizado para la tinción con el objetivo de diluir la carbocianina lo suficiente como para disminuir significativamente su penetración en la membrana celular. Posteriormente, para eliminar la carbocianina DiD no internalizada por las células, éstas se centrifugaron a 1500 rpm durante 3 minutos y se procedió a la eliminación del sobrenadante para seguidamente añadir PBS y resuspender el pellet de células. Se aplicó el mismo procedimiento de centrifugación a 1500 rpm durante 3 minutos y de eliminación del sobrenadante.

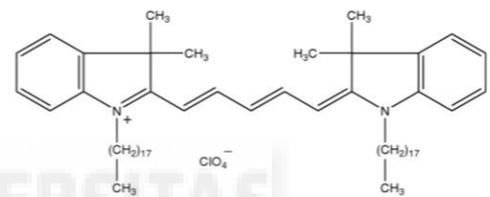


Figura 4. Estructura molecular de la carbocianina lipofílica DiD [Fuente 39]

Finalmente, las células se resuspendieron con medio de cultivo de U87 (Ver composición en **Tabla 2**) y se sembraron a dos condiciones experimentales, una con densidad de un millón de células por placa y otra con medio millón. La densidad celular se disminuyó tras la realización de la condición experimental de tiempo de tinción de 5 minutos, con el objetivo de mejorar el marcaje al haber menos

cantidad de células para la misma cantidad de carbocianina. El cultivo se realizó en una placa a la que anteriormente se le habían colocado cubreobjetos estériles sobre los que crecerían las células.

3.1.5 Mantenimiento de las células en cultivo y protocolo de fijación celular

Las células en cultivo se mantuvieron en un incubador (Incusafe MCO-18AC-PE) a 37°C de temperatura con 5% de CO₂ y se monitorizaron diariamente a través de la fijación de uno de los cubreobjetos ubicados en la placa de cultivo para poder observar posteriormente su fluorescencia bajo microscopio.

En primer lugar, se aplicó un lavado con PBS para eliminar los restos de medio de cultivo y desechos celulares. A continuación, se añadió paraformaldehído al 4% en 0,1 M PB (Phosphate Buffer, Tampón fosfato) dos veces, la primera vez durante 5 minutos y la segunda durante 20 minutos. El modo de acción del paraformaldehído, radica en su unión a las proteínas propiciando la aparición de una red de entrecruzamientos de sus grupos funcionales lo que da lugar a la inactivación de la gran mayoría de las enzimas celulares, bloqueando su acción degradativa sobre los componentes celulares [40]. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS durante 5 minutos cada uno para eliminar los restos de paraformaldehído. Para terminar, se realizó una tinción con el agente HOECHST (HOECHST 33342, Sigma-Aldrich) en concentración 1:300 que por ser intercalante de ADN, tiñe la cromatina, permitiendo visualizar los núcleos celulares y posibilitando la contabilización de las células totales. La absorción máxima de este compuesto se da a 355 nm de longitud de onda y emisión máxima a 465 nm de longitud de onda, correspondiente al azul cuando está acomplejado con el ADN. Conjuntamente con el marcador nuclear HOECHST, se añadió un agente de antifading (Carbonato sódico anhidro 0,1 M de Panreac + Glicerol 1:2 de AppliChem Panreac), con el objetivo de reducir el fotoblanqueamiento y así alargar la vida fluorescente de la carbocianina y el HOECHST en la muestra. Este agente influye en los estados electrónicos de los fluoróforos responsables de sus características fluorescentes, favoreciendo su fotoestabilidad [41]. En la **Tabla 3** se muestra un resumen del experimento/protocolo de tinción de las células y recogida de muestras.

Tabla 3: Resumen del experimento de tinción de las células y tiempos de recogida de muestras.

Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
Tripsinización y tinción de U87 con DiD durante 5' a una densidad celular de 1 millón de células en la placa (DIV. 0)	Tripsinización y tinción de U87 con DiD durante 10' a una densidad celular de medio millón de células en la placa (DIV. 0)	Tripsinización y tinción de U87 con DiD durante 15' a una densidad celular de medio millón de células en la placa (DIV. 0)
Fijación a DIV.3	Fijación a DIV.1	
Fijación a DIV.4	Fijación a DIV.2	
Fijación a DIV.5	Fijación a DIV.6	
Fijación a DIV.6	Fijación a DIV.7	
Fijación a DIV.7	Fijación a DIV.8	
Fijación a DIV.10	Fijación a DIV.9	
Fijación a DIV.11	Fijación a DIV.16	
Fijación a DIV.12	Fijación a DIV.19	
Fijación a DIV.13	Fijación a DIV.20	
Fijación a DIV.14		
Fijación a DIV.17		

DIV.: día in vitro, tiempo en días desde que se sembró la placa con células.

3.1.6 Seguimiento de la fluorescencia celular

Las muestras obtenidas fueron observadas con un microscopio Apotome Zeiss-1025141747 bajo iluminación por lámparas de mercurio de arco corto (HXP 120V). Cada una se fotografió a 200 aumentos en 6 campos diferentes de 625 μm^2 . En cada campo se realizaron dos fotos con dos juegos de filtros diferentes. La primera foto con el juego de filtros 49 DAPI que filtra la radiación de la fuente luminosa, que permite el paso de una radiación excitante sobre la muestra con una intensidad máxima

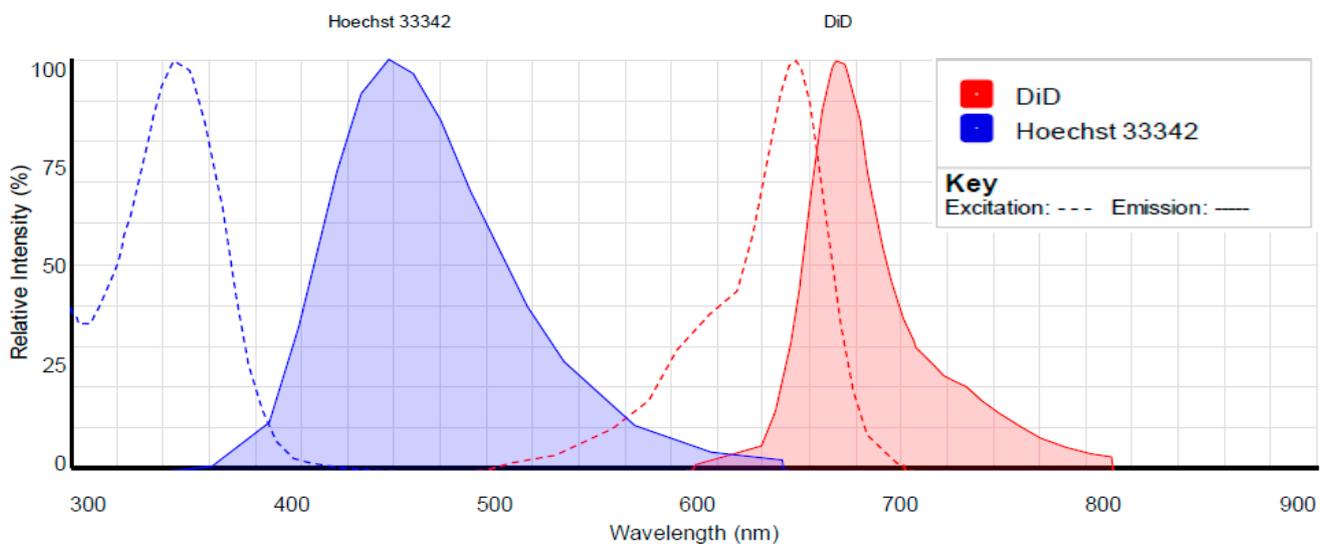


Figura 5. Espectros de excitación y emisión de los marcadores Hoechst y DiD [42]

a una longitud de 365 nm y filtra la radiación fluorescente emitida dando lugar a una intensidad máxima entre 445 y 450 nm, correspondiente a la detección del HOECHST y otra con el juego de filtros 50 Cy5 que filtra la radiación incidente, dando lugar a una radiación excitante con una intensidad máxima a 640 y 630 nm y filtra la radiación fluorescente emitida con un máximo entre 690 y 650 nm que localiza la fluorescencia procedente del DiD, de acuerdo con los espectros de excitación y emisión de ambas sustancias incluidos en la **Figura 5** [37].

3.1.7 Análisis de las muestras fluorescentes

El análisis informático de las fotos tomadas se llevó a cabo mediante el software ImageJ versión 1.50i. La información obtenida a partir de los campos durante cada día, fue la siguiente:

1. Número de células totales por cada $625 \mu\text{m}^2$ a partir del recuento del número de núcleos teñidos por HOECHST.
2. Número de células teñidas con DiD por cada $625 \mu\text{m}^2$.
3. Porcentaje de células teñidas con DiD del total de células.
4. Intensidad de fluorescencia de las células teñidas con DiD.

Los dos primeros datos se obtuvieron a partir de la extensión *Cell Counter* que permite el recuento de células mediante su selección manual, mientras que la intensidad de fluorescencia se contabilizó a partir de la herramienta de análisis *Histogram*, que, tras seleccionar el área de cada célula, devuelve un valor de intensidad del color deseado, en este caso rojo. Los datos obtenidos fueron analizados y ajustados a una regresión por medio del programa IBM® SPSS® Statistics, versión 23.

3.2 PROCEDIMIENTOS *IN VIVO*

El análisis de los resultados de los experimentos *in vitro* determinó que el tiempo óptimo de tinción con DiD era de 15 minutos ya que la fluorescencia se mantenía en las células durante un tiempo superior a dos semanas. En vista a estos resultados se procedió al desarrollo del modelo animal de GBM que consistió en la introducción quirúrgica de células U87 teñidas con la carbocianina DiD.

Durante los días posteriores, se realizó un seguimiento de los animales, atendiendo a parámetros como el peso y el comportamiento del animal, para garantizar el bienestar del animal y analizar los efectos del crecimiento del tumor en las ratas. Los animales fueron sacrificados a 6 y 14 días tras la operación, para poder evaluar el desarrollo del tumor lo que determinará la idoneidad del modelo [43].

3.2.2 Protocolo de inyección intracraneal de células U87

Durante el día previo y el correspondiente a la cirugía se trató a las ratas con el antiinflamatorio dexametasona por vía intraperitoneal a una dosis de 1 mg/kg. El objetivo es el de minimizar la inflamación cerebral y por lo tanto los posibles daños al tejido como consecuencia de la propia cirugía.

El día de la operación, a las ratas se les aplicó Ketamina (Richter pharma ag) por vía intraperitoneal como inductor de anestesia y analgésico, a una dosis de 70 mg/kg y se mantuvo el estado de anestesia con isoflurano (Esteve) al 2,5% por vía inhalatoria. Tras la desinfección con antiséptico de la zona a operar, se fijó al animal en el instrumento estereotáxico, con el

objetivo de localizar la coordenada craneal donde introducir las células y se realizó una incisión longitudinal a lo largo de la línea media. Se practicó la craneotomía en las coordenadas 1 mm posterior a bregma, 3 mm lateral en el lado izquierdo y 4,5 mm de profundidad (**Figura 6**) [44] que se seleccionaron tras una búsqueda bibliográfica [45,46,47]. Estas coordenadas se corresponden con el putamen, un núcleo cerebral encargado del control motor, por lo que durante el desarrollo del tumor se vigilaron posibles alteraciones motoras en los animales. Toda la cirugía se realizó en condiciones de esterilidad.

Las células a inyectar, fueron teñidas previamente con DiD durante 15 minutos, resuspendidas en PBS y ajustadas a una densidad de 100.000 células/ μ L por el protocolo de tripsinización y tinción celular desarrollado anteriormente en el apartado de procedimientos *in vitro*. Para realizar la inyección, se utilizó una jeringuilla Hamilton con calibre 26 G. La inyección de las células fue progresiva, prolongándose durante varios minutos hasta inyectar un total de 1,3 μ L de células U87 en un flujo aproximado de 0,1 μ L/min. Una vez finalizada la inyección se esperó entre 5 a 10 minutos antes de la extracción de la jeringa. Seguidamente, se procedió a la sutura de la herida y aplicación local de tobramicina (Alcori®) a una dosis de 3 mg/g por vía tópica, un antibiótico destinado a evitar la aparición de infecciones. Posteriormente, se realizó una inyección subcutánea de buprenorfina (Buprex®) para la analgesia, enrofloxacino (Alsir®) como antibiótico y meloxicam (Metacam®) como antiinflamatorio, a dosis de 0,05 mg/kg, 0,2 mL/kg y 2 mg/kg, respectivamente. La analgesia se reforzó mediante tratamiento oral con paracetamol (Apiretal®) en agua de bebida *ad libitum* en una concentración de 100 mg/ml, en una dosis aproximada de 2 g/kg día. Durante los 3 días siguientes a la operación, se

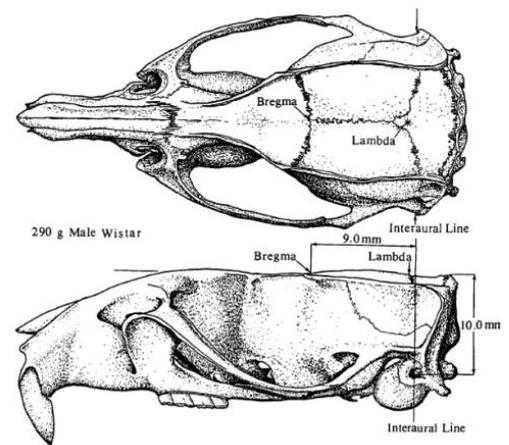


Figura 6. Vista superior y lateral del cráneo de una rata de la raza Wistar, mostrando las posiciones de bregma, lambda y el plano de la línea interaural [44].

inyectó una vez al día, buprenorfina (Buprex®), enrofloxacino (Alsir®) y meloxicam (Metacam®) en las dosis indicadas anteriormente.

3.2.3 Seguimiento de los animales

Durante todo el desarrollo del experimento, se controló diariamente el estado del animal con el objetivo de analizar los posibles efectos del crecimiento del tumor dentro de la cavidad craneal y de aplicar, solo en caso necesario, el protocolo de punto final o eutanasia del animal, a través de varios parámetros [48]:

- Control del peso: Ambos animales, fueron pesados diariamente con el fin de detectar posibles disminuciones anormales en el peso, considerando como anormal una disminución del peso mayores del 5 o 10%.
- Respuesta al manejo: Se observó la respuesta del animal al manejo, atendiendo a apariciones de comportamientos agresivos o falta de respuesta.
- Control del comportamiento normal del animal: Los roedores, son animales que tienden a presentar comportamientos sociales como la observación del entorno e interacción con el cuidador. Además, presentan conducta ocasional de limpieza y tienden a formar nidos a partir de papel o cualquier material similar a su alcance.
- Control del dolor: El dolor, fue cuantificado en los animales a partir del código de expresiones faciales de la **Figura 7** [49].
 - o Tensión en la zona orbital: Se refiere al estrechamiento de esta zona, que puede dar lugar a que el animal cierre los ojos, incluso apretando con fuerza, lo que se denota por la aparición de arrugas alrededor de los ojos.
 - o Abultamiento en la nariz, visible en el puente de esta.
 - o Abultamiento en la mejilla: Es un abultamiento entre el ojo y los bigotes dando lugar a una apariencia convexa.
 - o Posición de las orejas: Las orejas pierden su posición normal, orientando sus puntas hacia atrás en lugar de hacia arriba.
 - o Cambio en los bigotes: Se da cuando los bigotes no presentan su apariencia ordenada habitual.

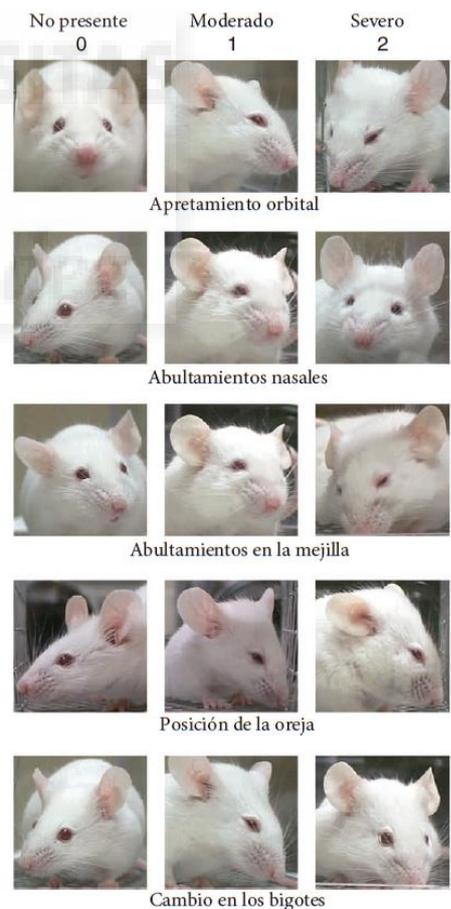


Figura 7. Código de las expresiones faciales de roedores. Por medio de estos 5 signos, es posible cuantificar el dolor o estrés en los roedores de laboratorio. [Fuente 49]

- Control de la aparición de fenómenos y comportamientos anormales [48]:
 - Estereotipias: Se trata de conductas simples, frecuentes, repetitivas, invariables y sin función aparente que pueden aparecer en el animal por diversas razones como el estrés o disfunciones del SNC.
 - Piloerección: consecuencia de un estado de alerta en el animal, dolor o estrés en general.
 - Exudado nasal u ocular: puede ser el resultado de infecciones nasales u oculares.
 - Secreción de porfirinas: las ratas poseen una glándula que secreta el pigmento rojizo porfirina y en condiciones normales el propio animal se encarga de retirarla, sin embargo, en condiciones de falta de higiene o hipersecreción por estrés, enfermedad u otros factores, el animal puede presentar manchas rojas habitualmente alrededor de los ojos.
 - Espalda arqueada: Producido por diversas razones, como el dolor, estrés o miedo.
 - Heridas: al encontrarse los animales en jaulas individuales, las heridas solo pueden ser consecuencia del propio animal sobre sí mismo, denotando un estado estresado.
 - Convulsiones, diarrea, coma, automutilaciones, distrés respiratorio severo, pérdida de sangre significativa, deshidratación severa: se trata de fenómenos muy graves que al aparecer en el animal indican que puede ser aconsejable la eutanasia.

El seguimiento del animal, teniendo en cuenta estos fenómenos, permitirá evaluar el grado de sufrimiento del animal al aparecer indicadores negativos o determinará el bienestar de la rata si presenta el comportamiento normal típico de su especie.

3.2.4 Eutanasia, perfusión del animal y fijación del cerebro

Transcurridos 6 y 14 días de la operación los animales fueron sacrificados para la fijación y extracción del cerebro con el objetivo de poder analizar histológicamente el desarrollo del tumor durante estos tiempos. Para ello, se indujo la anestesia a la rata con isoflurano por vía inhalatoria, y a continuación se administró, tras diluirlo por ser irritante, pentobarbital sódico (Doletal®) por vía intraperitoneal en una dosis de 40 mg/Kg para una anestesia profunda.

A continuación, se procedió a la fijación del cerebro por medio de la perfusión del animal. Para ello, se descubrió la caja torácica tras realizar una incisión en el torax y se procedió a cortar las costillas del animal para acceder al corazón. A continuación, se inyectó PB 0,2 M en el ventrículo izquierdo del corazón, impulsado con una bomba (PERCOM-I, J.P. Selecta s.a.) a un flujo de 7,5 mL/min, se cortó la aurícula derecha y se clampó el sistema circulatorio descendente que compone la aorta descendente y da lugar al riego corporal caudal. Una vez inyectados 250 mL de PB aproximadamente, se inició el flujo de PFA 4 %, que contribuye a la fijación del tejido, inyectándose un volumen similar.

Una vez terminada la perfusión, se procedió a la extracción del cerebro, órgano donde se encuentra el tumor, para introducirlo en PFA 4% donde permaneció durante al menos 72 horas de postfijación para su posterior procesado histológico.

3.3. HISTOLOGÍA

Una vez fijado el cerebro, se crioprotegió por medio de un gradiente creciente de concentración de sacarosa disuelto en PB 0,1 M con el objetivo de que el órgano adquiriera una concentración intracelular en sacarosa que impidiera que el agua de su interior cristalizara durante la posterior congelación. Las concentraciones de sacarosa utilizadas fueron de 15%, 20% y 30%, permaneciendo el órgano en las dos primeras durante el tiempo necesario para que la densidad y, por tanto, la concentración en sacarosa del interior del cerebro se igualara con la del medio, decantando entonces al fondo del recipiente. En la última concentración de sacarosa, el órgano permaneció al menos 24 horas para garantizar que la sacarosa penetrara completamente.

Tras la aplicación de la crioprotección, se realizó la congelación del tejido mediante hielo seco, la denominación que recibe el dióxido de carbono congelado. Este procedimiento permite la congelación rápida del tejido, previniendo la formación de cristales y facilitando la congelación homogénea en todo el órgano. Para ello, se sumergió el tejido en el hielo seco por medio de un casete de acero inoxidable y se dejó durante unos segundos en los cuales la muestra se enfrió rápidamente. Una vez congelado, se fijó a un soporte mediante la aplicación de medio de congelación de tejidos OCT (*tissue freezing medium*, Electron Microscopy Sciences) y se cortaron las muestras a 12 μm de grosor en un criostato (HM-I 505E, Microm).

Estos cortes, fueron divididos en dos grupos principales que fueron alternando en toda la longitud del tejido. El primer grupo de cortes se utilizó para tinción de Hematoxilina/Eosina mientras que el segundo se dejó sin teñir y se utilizó para la observación directa de fluorescencia. El tercer grupo, más reducido, se utilizó para la realización de inmunohistoquímica

3.3.1 Tinción Hematoxilina/Eosina

La tinción de hematoxilina/eosina se basa en el carácter ácido o básico de los distintos componentes celulares. La hematoxilina, por su carácter catiónico o básico tiene afinidad por las estructuras ácidas entre ellas, los núcleos celulares, mientras que la eosina posee un carácter aniónico o básico y tiñe los componentes celulares básicos como el citoplasma. Tras la batería de tinción, se procede a la deshidratación progresiva de la muestra por medio de alcoholes etílicos de concentración creciente y xilol para alargar la vida de la muestra y se procede al montaje final por el cual se añade medio de montaje (Akralab) sobre las muestras y se cubren con un cubreobjetos. Esta tinción permitirá

diferenciar las células del tumor de las del tejido normal, al formar el tejido tumoral grandes núcleos desorganizados, heterogéneos y en mayor densidad que el tejido sano.

Se optimizaron los tiempos de la tinción de hematoxilina y eosina en función de las soluciones y el grosor de las secciones de tejido cerebral. El orden de los compuestos y tiempos utilizados fue el siguiente:

- | | | | |
|-------------------------|-------------|------------------|-----------|
| 1. Agua destilada, | 5 minutos | 7. Alcohol 70%, | 2 minutos |
| 2. Hematoxilina, | 30 segundos | 8. Alcohol 96%, | 2 minutos |
| 3. Agua destilada, | 10 minutos. | 9. Alcohol 100%, | 3 minutos |
| 4. Agua destilada, | 5 minutos. | 10. Xilol I, | 3 minutos |
| 5. Eosina, | 15 minutos. | 11. Xilol II, | 5 minutos |
| 6. Agua destilada, | 3 minutos. | 12. Montaje | |

➤ *Tamaño del tumor*

Se utilizó la tinción de Hematoxilina-Eosina para la determinación del tamaño del tumor. Para ello, se contaron los cortes en los que estaba presente el tumor y se calculó la longitud del tumor en el eje rostro-caudal, atendiendo a que cada corte poseía 12 μm de grosor. Para el cálculo de las dimensiones del tumor en los ejes latero-lateral y dorso-ventral, se buscaron los cortes correspondientes al centro y los localizados aproximadamente al principio y al final del tumor y se midieron, por medio del programa ImageJ.

3.3.2 Inmunohistoquímica

Se aplicaron técnicas inmunohistoquímicas a un grupo de muestras adyacentes procedentes del centro aproximado del tumor con el propósito de que fueran más relevantes y representativas. El objetivo de estas pruebas fue la caracterización molecular del tumor.

Este procedimiento consiste en la identificación de la presencia de proteínas celulares por medio de la unión de anticuerpos específicos. En todos los casos se utilizó en primer lugar un anticuerpo primario específico de la proteína a identificar y, finalmente, uno secundario cuya finalidad es la de unirse al primario, dando lugar a una señal fluorescente. Al poder unirse varios anticuerpos secundarios al anticuerpo primario, la señal fluorescente final se verá amplificada.

El proceso comenzó con 3 lavados con PB 0,1 M durante 10 minutos cada uno, para diluir y extraer el medio de congelación de tejidos OCT. Después, se usó albúmina de suero bovino con Tritón (BSA, *bovine serum albumin*, Sigma, 10% BSA + PB 0,1 M + 0,5 % Tritón X-100, Electron Microscopy Sciences) durante 1 hora, con el objetivo de bloquear los sitios de unión inespecíficos de la muestra. A continuación, se aplicó el anticuerpo primario y se dejó actuando durante 24 horas en cámara húmeda,

refrigeración, agitación y oscuridad favoreciendo su acción. Pasado este tiempo, se volvieron a efectuar 3 lavados con PB 0,1 M durante 10 minutos cada uno para eliminar los restos de anticuerpo primario no unido a la muestra y se utilizó el anticuerpo secundario conjuntamente con el marcador nuclear HOECHST, dejándose actuar durante 1 hora. Entonces, se realizaron otros 3 lavados con PB 0,1 M durante 5 minutos cada uno para eliminar el anticuerpo secundario no unido a la muestra y dejar la muestra lista para su montaje final con agente de antifading, explicado anteriormente en el apartado de *Protocolo de fijación con paraformaldehído*.

Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados se disolvieron en PB 0,1 M y 0,5 % de detergente Tritón que estabiliza los anticuerpos en el medio acuoso y facilita su entrada en el interior celular.

➤ *Anticuerpos utilizados*

Las proteínas diana de los anticuerpos primarios utilizados fueron las siguientes:

- **GFAP** (Glial fibrillary acidic protein, proteína fibrilar ácida de la glia). Se emplearon dos anticuerpos antiGFAP de diferentes casas comerciales (anticuerpo producido en ratón, clon 6F2, Dako, 1:100, MO761 y anticuerpo producido en conejo, policlonal, Sigma, 1:100, G9269): Se trata de una proteína fibrosa que forma el citoesqueleto y que es específica de las células gliales como los astrocitos y que se encuentra sobreexpresada en ciertos GBM [34,50].
- **CD31** (PECAM-1, platelet and endothelial cell adhesion molecule 1) (Anticuerpo producido en ratón, clon JC70A, DAKO, 1:100, MO823) Esta proteína se encuentra en la superficie de plaquetas, monocitos, neutrófilos y algunos tipos de células T y forma parte de las uniones intercelulares de las células endoteliales. En cuanto al cáncer, se ha determinado su presencia en células en división e implicadas en la angiogénesis [51].
- **Vimentina** (Anticuerpo producido en ratón, clon 9E7E7, Santa Cruz, 1:200, sc-66001). Se trata de una subunidad que forma el filamento intermedio que se expresa típicamente en células embrionarias y tumorales. Su presencia es común en tumores como el GBM [34].
- **VEGF** (Anticuerpo producido en ratón, clon VG1, DAKO, 1:100, M7273). Como se explicó en la introducción, se trata de una proteína implicada en la angiogénesis sobreexpresada por el GBM.
- **IBA-1** (ionized calcium-binding adapter molecule 1) (Anticuerpo producido en ratón, MAB15682014, Millipore, 1:200): Es una proteína presente en la microglía activada, y al proceder el GBM de células gliales se decidió utilizarlo sobre el tumor para comprobar su expresión [52].

En cuanto a los anticuerpos secundarios, se utilizó el anticuerpo anti-ratón, producido en asno, policlonal, de Live tech, A21202 contra todos los anticuerpos primarios producidos en ratón que son todos los enumerados anteriormente excepto el GFAP G9269 de Sigma producido en conejo, contra el

cual se utilizó el anticuerpo secundario anti-conejo, policlonal, de Live tech, A21206. Conjuntamente con los anticuerpos secundarios, se añadió el marcador nuclear HOECHST explicado en el apartado de *Protocolo de fijación con paraformaldehído* con el objetivo de poder identificar los núcleos.

4. RESULTADOS

4.1 RESULTADOS IN VITRO

Tras observar la evolución de las células en cultivo y obtener los datos de fluorescencia procedente del DiD con el programa ImageJ, se procedió a su análisis. Este análisis se realizó con el propósito de determinar la condición experimental más adecuada para garantizar la fluorescencia en las células tumorales durante el desarrollo del xenoinjerto. En la **Figura 8** se observa como la fluorescencia se ve reducida desde el primer día tras la tinción hasta el DIV. 20, en intensidad y proporción de células fluorescentes.

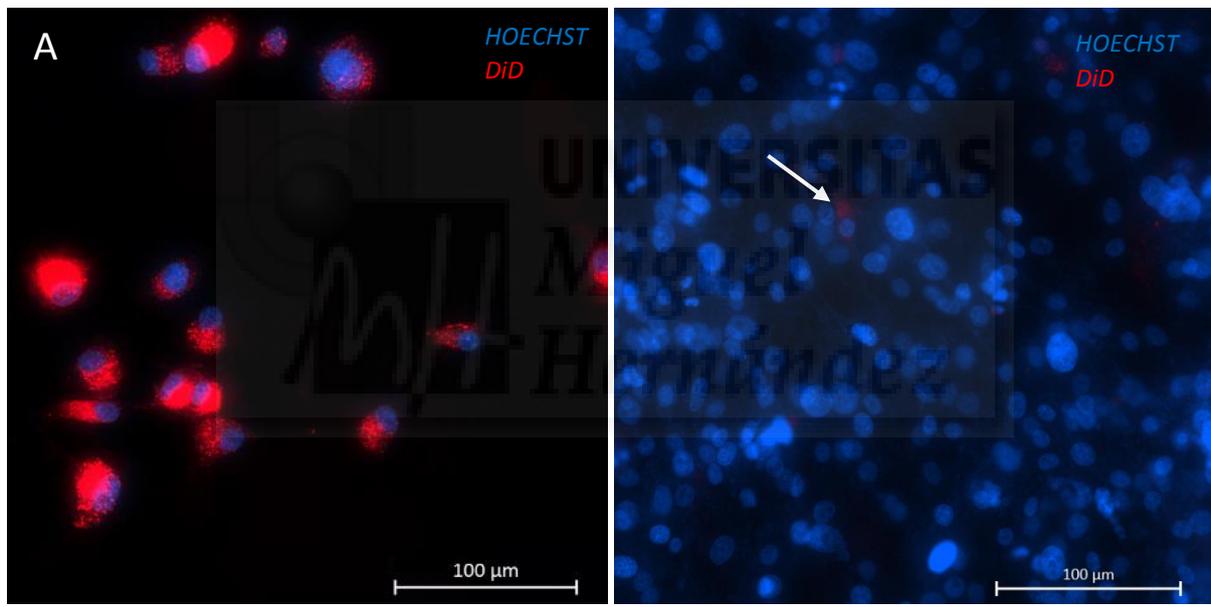
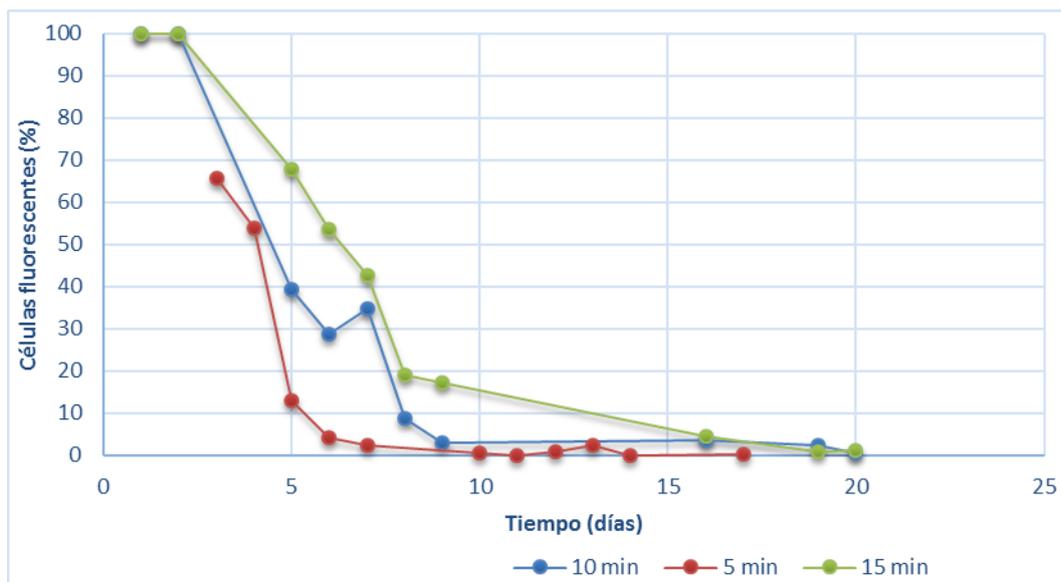


Figura 8. Imagen a 200 aumentos, de células U87 en cultivo en rojo (DiD) y los núcleos celulares en azul (HOECHST). A) DIV. 1, la densidad celular es baja y la fluorescencia procedente del DiD alta. B) DIV. 20, la densidad celular es alta y la fluorescencia procedente del DiD (flecha) muy baja.

4.1.2 Ajuste de regresión: Porcentaje de células fluorescentes

Con los datos experimentales obtenidos en las mediciones, se ajustó un modelo de regresión del porcentaje de células fluorescentes en función del tiempo, que permitiera la elección de las condiciones de tiempo de tinción y número de células iniciales. Para ello, en primer lugar, se observaron las representaciones gráficas de los datos (**Gráfica 1**)



Gráfica 1. Porcentaje de células fluorescentes en función del tiempo en días de las condiciones experimentales de tinción aplicadas: 5 min (rojo), 10 min (azul) y 15 min (verde)

A partir de la representación gráfica de los datos de la **Gráfica 1**, se seleccionaron modelos matemáticos que podrían ajustar la disminución del porcentaje celular en función del tiempo. A fin de que los ajustes de regresión que se tuvieron en cuenta inicialmente fueron el lineal, el cúbico, el cuadrático, el logarítmico, el inverso, el potencial y el exponencial, al semejarse su tendencia a la de los datos. El modelo cúbico y el cuadrático se descartaron porque aunque daban lugar a R^2 significativos, al aumentar la variable tiempo comenzaban a producir valores en el eje de abscisas negativos que posteriormente aumentaban hasta dar lugar a positivos lo que no tendría sentido biológico, al disminuir la fluorescencia siempre a consecuencia de la división de las células sin ser posible valores de fluorescencia negativa. El modelo exponencial y potencial no pudieron aplicarse en la condición experimental de 5 min, ya que esta presentaba en el día 14 el valor 0 en el porcentaje de células fluorescentes, incompatible con este modelo. En la **Tabla 4** se resumen los modelos explicados y se establecen los parámetros para cada condición experimental.

Resumen del modelo y estimaciones de los parámetros para condición experimental tiempo de tinción: 5 min

Ecuación	Resumen de la bondad de ajuste del modelo					Estimaciones de parámetro	
	R^2	F	gl1	gl2	p-valor	Constante	b1
Lineal	,497	8,882	1	9	,015	46,769	-3,641
Logarítmico	,682	19,322	1	9	,002	85,212	-34,451
Inverso	,839	46,902	1	9	,000	-22,393	247,363

**Resumen del modelo y estimaciones de los parámetros
para condición experimental tiempo de tinción: 10 min**

Ecuación	Resumen de la bondad de ajuste del modelo					Estimaciones de parámetro	
	R ²	F	gl1	gl2	p-valor	Constante	b1
Lineal	,630	13,618	1	8	,006	74,142	-4,523
Logarítmico	,895	68,130	1	8	,000	104,200	-37,900
Inverso	,797	31,467	1	8	,001	4,133	115,914
Potencia	,788	29,720	1	8	,001	265,366	-1,648
Exponencial	,865	51,148	1	8	,000	113,166	-,246

**Resumen del modelo y estimaciones de los parámetros
para condición experimental tiempo de tinción: 15 min**

Ecuación	Resumen de la bondad de ajuste del modelo					Estimaciones de parámetro	
	R ²	F	gl1	gl2	p-valor	Constante	b1
Lineal	,801	32,131	1	8	,000	88,140	-5,104
Logarítmico	,920	91,441	1	8	,000	113,848	-38,452
Inverso	,681	17,107	1	8	,003	14,820	107,251
Potencia	,743	23,107	1	8	,001	341,722	-1,563
Exponencial	,972	278,957	1	8	,000	185,840	-,254

Variable dependiente: Porcentaje de células fluorescentes. Variable independiente: Dias.

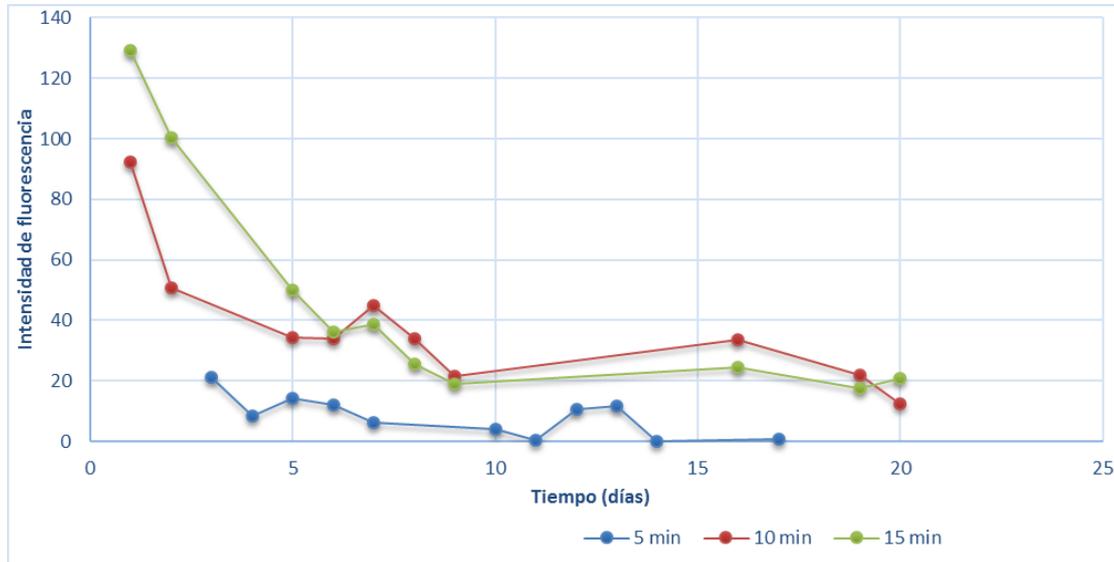
Tabla 4. Ajustes de regresión aplicados y estimaciones de los parámetros de las funciones de cada modelo de regresión. R²: coeficiente de determinación de bondad de ajuste; F: cociente entre dos medidas cuadráticas, determina la bondad de ajuste. Gl: grados de libertad. El modelo resaltado en amarillo en cada condición experimental es el que posee un R² superior.

El modelo que alcanzó el mejor ajuste con los datos al poseer un coeficiente de determinación (R²) superior, fue diferente en cada condición experimental por lo que para la elaboración del modelo predictivo se debería aumentar el tamaño muestral para que los datos se ajustaran a una misma cinética en cualquier condición.

En la condición experimental 5 minutos de tinción y 10⁶ células iniciales, el modelo que mejor ajuste planteaba fue el inverso, con un R² de 0,839, es decir, el modelo explica el 83,97% de la varianza. Con este modelo es factible el cálculo de los días a partir de los cuales el valor de la fluorescencia tiende a cero, resultando en 11 días en este experimento. En cuanto a la condición experimental de 10 minutos de tiempo de tinción y 5·10⁵ células iniciales, el modelo que mejor ajuste planteaba era el logarítmico con un coeficiente de determinación de 0.895 que quiere decir que el modelo explica, respectivamente, el 89,5 % de la varianza. Por último, la condición experimental tiempo de tinción de 15 minutos de tinción y 5·10⁵ células iniciales, el coeficiente de determinación para el modelo exponencial es R² = 0.972 superior al resto de modelos y explicando el 97,2% de la varianza.

4.1.3 Ajuste de regresión: Intensidad de fluorescencia.

Para ajustar el modelo de regresión, como en el caso anterior, se observaron las representaciones gráficas de los datos (**Gráfica 2**).



Gráfica 2. Intensidad de fluorescencia en función del tiempo en días de las condiciones experimentales de tinción aplicadas: 5 min (rojo), 10 min (azul) y 15 min (verde)

De igual manera que en el caso anterior, tras observar las gráficas se buscó un modelo al que se ajustaran los datos experimentales. Se comenzó, nuevamente con los modelos lineal, el cúbico, el cuadrático, el logarítmico, el inverso, el potencial y el exponencial de los cuales se descartaron el ajuste cúbico y el cuadrático al comprender incrementos en la fluorescencia, al cabo de un tiempo, lo que no tiene sentido biológico. Como anteriormente, el modelo exponencial y potencial no pudieron aplicarse en la condición experimental de 5 min, por presentar en algunos días valores de 0 en la intensidad de fluorescencia, lo cual puede tener su origen en que tamaño muestral fue insuficiente por lo que para ajustar de manera adecuada sería necesario aumentarlo.

Resumen del modelo y estimaciones de los parámetros para condición experimental tiempo de tinción: 5 min

Ecuación	Resumen de la bondad de ajuste del modelo					Estimaciones de parámetro	
	R ²	F	gl1	gl2	p-valor	Constante	b1
Lineal	,475	8,132	1	9	,019	17,441	-1,004
Logarítmico	,535	10,343	1	9	,011	26,159	-8,600
Inverso	,565	11,713	1	9	,008	-0,060	57,261

**Resumen del modelo y estimaciones de los parámetros
para condición experimental tiempo de tinción: 10 min**

Ecuación	Resumen de la bondad de ajuste del modelo					Estimaciones de parámetro	
	R ²	F	gl1	gl2	p-valor	Constante	b1
Lineal	,526	8,868	1	8	,018	60,088	-2,372
Logarítmico	,794	30,805	1	8	,001	77,020	-20,487
Inverso	,883	60,207	1	8	,000	21,157	70,002
Potencia	,754	24,563	1	8	,001	84,108	-,487
Exponencial	,660	15,496	1	8	,004	60,825	-,065

**Resumen del modelo y estimaciones de los parámetros
para condición experimental tiempo de tinción: 15 min**

Ecuación	Resumen de la bondad de ajuste del modelo					Estimaciones de parámetro	
	R ²	F	gl1	gl2	p-valor	Constante	b1
Lineal	,541	9,439	1	8	,015	84,696	-4,143
Logarítmico	,890	64,902	1	8	,000	117,253	-37,359
Inverso	,930	106,954	1	8	,000	16,328	123,751
Potencia	,906	76,706	1	8	,000	132,861	-,682
Exponencial	,669	16,185	1	8	,004	78,783	-,083

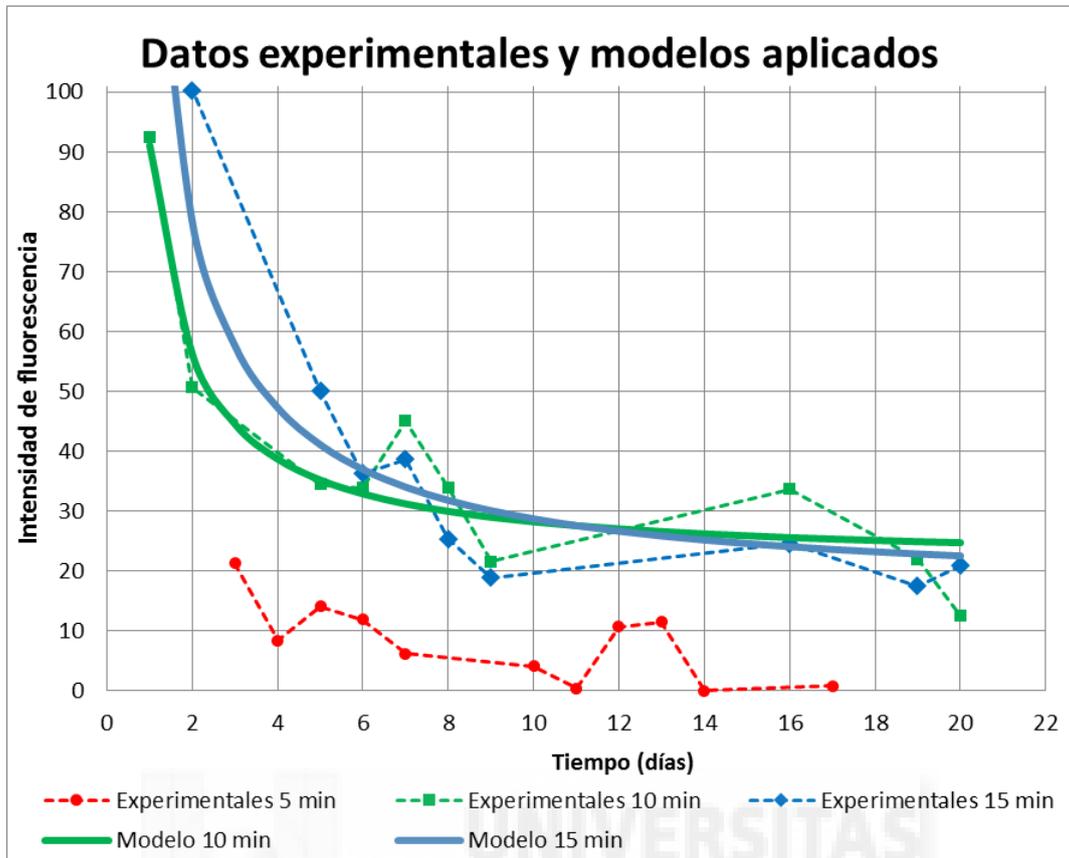
Variable dependiente: Intensidad. Variable independiente: Días.

Tabla 5. Ajustes de regresión aplicados y estimaciones de los parámetros de las funciones de cada modelo de regresión. R²: coeficiente de determinación de bondad de ajuste; F: cociente entre dos medidas cuadráticas, determina la bondad de ajuste. Gl: grados de libertad. El modelo inverso está resaltado en amarillo al poseer un R² superior en todos los casos.

El modelo inverso fue el seleccionado, al presentar valores de R² significativos en las 3 condiciones experimentales (**Tabla 5**), cómo se explicará a continuación. Además, es aplicable en las 3 condiciones ya que contempla valores de 0, que no contemplan el logarítmico y el exponencial. Las gráficas de los datos experimentales se parecen a una curva del tipo función inversa (**Ecuación 1**) como se observa en la **Gráfica 3**.

$$Y = \alpha + \beta \frac{1}{X}$$

Ecuación 1. Función inversa. Y correspondería a la proporción sobre 1 de las células con fluorescencia, X al número de días desde la tinción, α al parámetro constante y β al parámetro b1.



Gráfica 3. Intensidad de fluorescencia frente a tiempo en las condiciones experimentales desarrolladas: 5 (línea roja discontinua), 10 (línea verde discontinua) y 15 (línea azul discontinua) min de tiempo de tinción y los modelos aplicables a las condiciones experimentales de 10 (línea verde continua) y 15 minutos (línea azul continua).

Los modelos finales para las diferentes condiciones experimentales se resumen en la **Tabla 6**.

Tabla 6: modelos matemáticos finales de las cinéticas de pérdida de intensidad de fluorescencia

Condición experimental	5 minutos de tinción y 10^6 células iniciales	10 minutos de tinción y $5 \cdot 10^5$ células iniciales	15 minutos de tinción y $5 \cdot 10^5$ células iniciales
Modelo	Ninguno	$Y = 21,157 + 70,002 \frac{1}{X}$	$Y = 16,328 + 123,751 \frac{1}{X}$

Los datos de la condición experimental 5 minutos de tinción y 10^6 células iniciales, no fueron ajustables a ningún modelo ya que el valor de R^2 para el mejor modelo, aunque fuera el inverso, es de solo 0,565 por lo que solo explicaría la mitad de la varianza. Mientras que para las condiciones experimentales de 10 y 15 minutos de tinción y $5 \cdot 10^5$ células iniciales, los coeficientes de determinación fueron respectivamente $R^2 = 0.883$ y $R^2 = 0.930$, lo que quiere decir que estos modelos explican, el 88,3% y el 93% de la varianza, los valores más altos alcanzados entre todos los modelos aplicados. Con los datos obtenidos, no es posible elaborar un modelo que prediga el día a partir del

cual el valor de la fluorescencia es cero, ya que el valor de la intensidad se estabiliza en torno a un valor de 21,157 y 16,328, respectivamente para los tiempos de medida de la fluorescencia en este experimento por lo que para poder calcularlo con seguridad sería necesario ampliar el tamaño muestral.

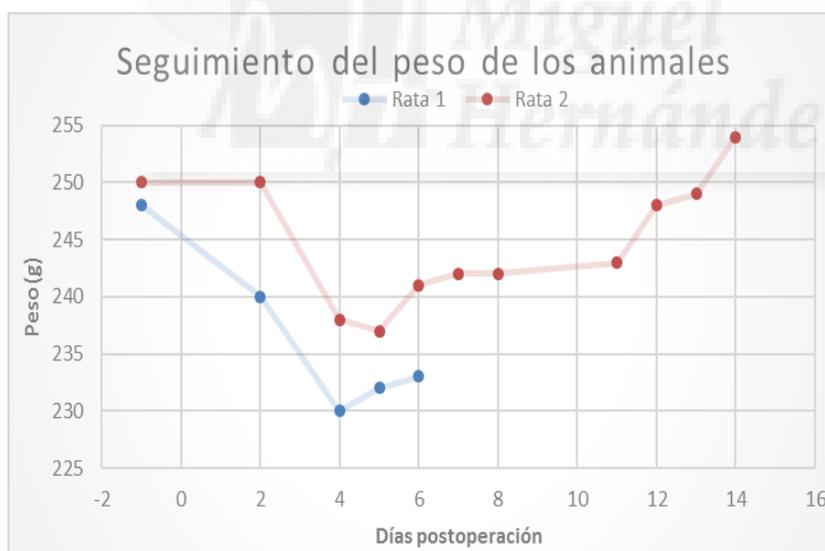
4.2 RESULTADOS *IN VIVO*

4.2.1 Seguimiento rutinario de los animales

Como se indicó en el apartado de *Seguimiento de los animales*, en *Materiales y métodos*, se controló diariamente el estado del animal con el objetivo de analizar los posibles efectos del crecimiento del tumor en el animal y de aplicar, solo en caso necesario, el protocolo de punto final o eutanasia del animal.

➤ *Peso de los animales a lo largo del experimento:*

El peso de las ratas, recogido en la **Gráfica 4**, fue controlado diariamente, atendiendo a que no se produjeran disminuciones anormales tras la operación. Considerando una pérdida de peso del 10% respecto al peso de los animales el día anterior a la operación como una disminución significativa en este parámetro [47]. La Rata 1 fue sacrificada a día 6 postoperación (po.) mientras que la Rata 2 se sacrificó a día 14 po.



Gráfica 4. *Peso de las ratas tras la cirugía en función del tiempo*

En el caso de la Rata 1, se da una disminución de peso desde el día de la operación, llegando a un máximo del 7,3 % el día 4 po. a partir del cual se observa una leve recuperación. En cuanto a la Rata 2, su peso no cambia hasta al menos el día 2 po. donde comienza una disminución que culmina el día 5 po. en una disminución máxima del 5,2 %. A partir de entonces, inicia una recuperación progresiva hasta su peso original, llegando incluso a superarlo ligeramente.

➤ *Control de comportamiento, estrés y dolor:*

Como se ha explicado en el apartado *Seguimiento de los animales*, en *Materiales y métodos* para la verificación del bienestar del animal, se atendió a la aparición de comportamientos anormales o a la desaparición de conductas típicas de la especie, mientras que para la cuantificación del dolor se recurrió a un código de expresiones faciales.

No se observaron marcadores que denotaran estrés o dolor severo en la Rata 1 antes de su sacrificio en el día 6 po., mientras que en la Rata 2 fueron apareciendo síntomas leves que aumentaron progresivamente hasta el día 13 po. y 14 po. cuando se le aplicó la eutanasia. Estos síntomas en la Rata 2 comenzaron el día 5 po al hallarse una raya roja sobre el pelaje de lomo derivada de la secreción de porfirinas, indicativo de estrés leve al ser normal el comportamiento del animal. A partir del día 7 po. se observaron algunos marcadores de dolor moderado como desviación hacia la parte posterior de la posición de las orejas y un desorden leve de los bigotes. Durante el día 13 po. se localizó una herida en el lomo de la rata, además de signos de estrés severo y dolor consistentes en el cambio drástico en la posición de las orejas, bigotes significativamente desordenados y la aparición de un bulto en la nariz, adicionalmente a la raya roja en el lomo indicada anteriormente. Además, la rata presentaba comportamiento de huida al manejo y temblores por todo el cuerpo.

4.3 RESULTADOS DEL ANÁLISIS HISTOLÓGICO

4.3.1 Histología macroscópica

Tras la eutanasia de ambas ratas y fijación de sus cerebros, se procedió al corte manual de estos órganos en las zonas que rodean al tumor para aislarlo del resto y facilitar su posterior procesado. Debido desarrollo del tumor, se aprecia en el corte de la **Figura 9** correspondiente a la Rata 2 que desarrolló el tumor durante 14 días, una considerable desaparición de tejido del cuerpo caloso y el hipocampo a consecuencia del aumento en el volumen del tumor que, al encontrarse en el interior del cráneo y requerir espacio para desarrollarse, destruyó las células sanas de esta zona. Además, se puede apreciar desorganización del tejido cerebral a consecuencia de la presión ejercida por el tumor. En el otro hemisferio se puede observar el hipocampo y cuerpo caloso más íntegro y el tejido más ordenado.

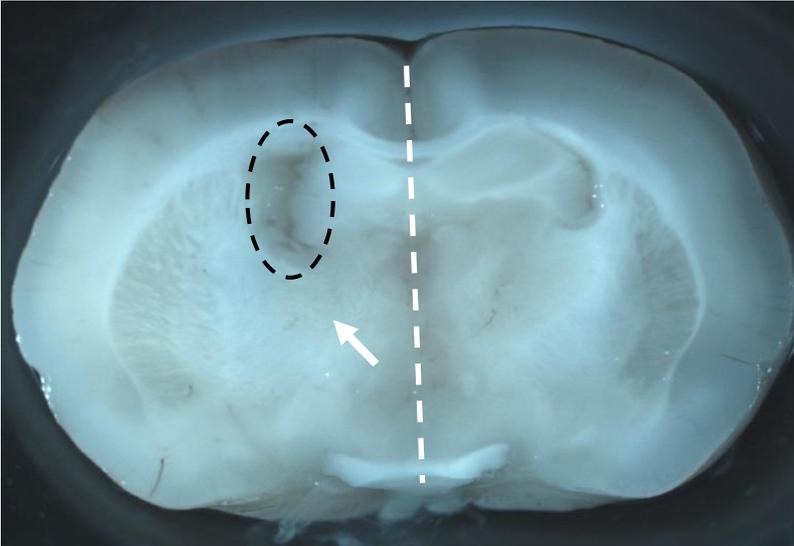


Figura 9. Cerebro de la Rata 2. Imagen fotográfica de una sección coronal de cerebro de rata. En el hemisferio izquierdo, a la izquierda de la lámina media (línea recta discontinua) se observa, una gran deformación y desorganización del tejido (flecha) y, desaparición tisular (línea de puntos) de gran parte de la región del hipocampo debida al crecimiento del tumor.

4.3.2 Tinción de Hematoxilina Eosina

Se realizó un análisis histológico microscópico con tinción de Hematoxilina/Eosina para determinar con mayor precisión el inicio, final y tamaño de los tumores. Esta tinción permite diferenciarlo del tejido sano, al formar el tejido tumoral núcleos celulares grandes, numerosos y agrupados en color azul, mientras que los núcleos de las células sanas que rodean el tumor son mucho más pequeños, dispersos y generalmente ordenados como se observa en la **Figura 10 y Figura 11**. En ambas imágenes podemos apreciar la forma redonda del tumor en contraposición con el tejido circundante, lo que permite visualizar su localización exacta.

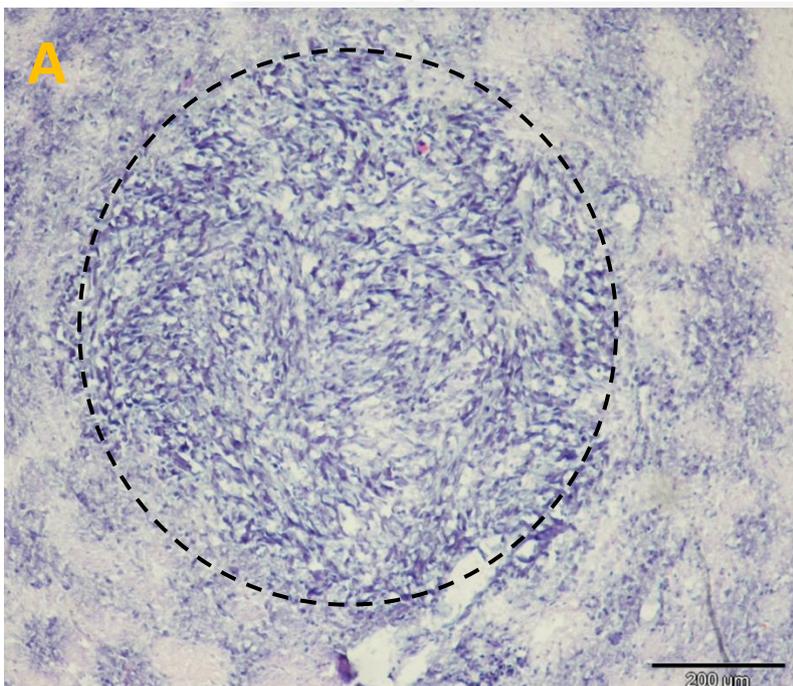


Figura 10. Imagen fotográfica a 200 aumentos de secciones histológicas teñidas con Hematoxilina-Eosina en las que se evidencia el tamaño del tumor delimitado por la línea discontinua. Rata 1, corte del cerebro perteneciente a células tumorales situadas en las secciones iniciales del tumor.

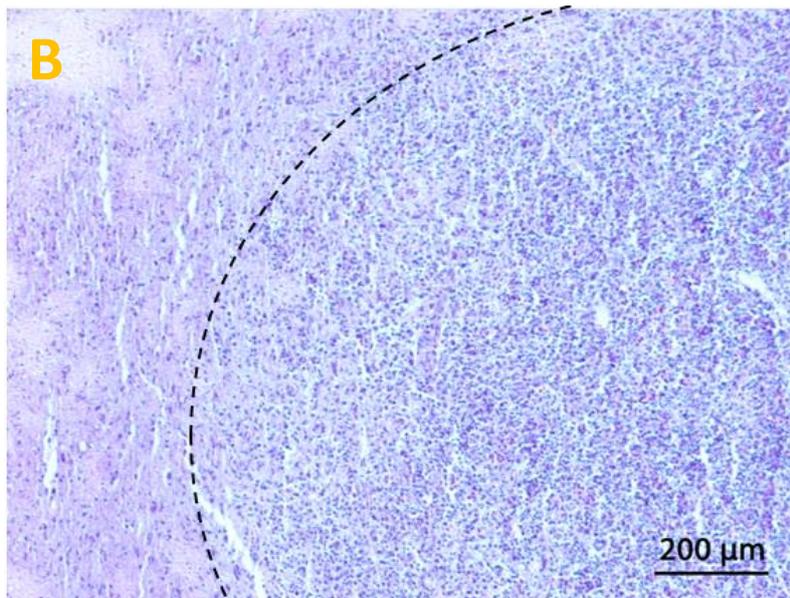


Figura 11. Imagen fotográfica a 200 aumentos de secciones histológicas teñidas con Hematoxilina-Eosina en las que se evidencia el tamaño del tumor delimitado por la línea discontinua. Rata 2, corte del cerebro perteneciente al centro del tumor.

➤ *Tamaño del tumor*

Como se indicó anteriormente, se utilizó la tinción de Hematoxilina-Eosina para la determinación del tamaño del tumor. En vista a los resultados obtenidos (**Tabla 7**), el crecimiento del tumor parece aumentar a lo largo del tiempo ya que se puede observar como el tamaño del tumor de la Rata 2, con un desarrollo de 2 semanas, tiene un tamaño mayor que el tumor de la Rata 1, en la que el tumor solo se desarrolló durante 6 días. Los datos obtenidos se resumen en la **Tabla 7**.

Tabla 7: Tamaño de los tumores en función de los ejes.

		Primer cuarto	Centro del tumor	Tercer cuarto	Eje rostro-caudal (mm)
Rata 1	Eje latero-lateral (mm)	1,296	1,441	1,216	1,656
	Eje dorso-ventral (mm)	0,811	1,213	1,121	
Rata 2	Eje latero-lateral (mm)	1,804	2,326	1,868	2,304
	Eje dorso-ventral (mm)	1,742	2,396	2,256	

4.3.3 Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica, como se explicó en el apartado de Materiales y métodos, se llevó a cabo utilizando anticuerpos contra 6 proteínas presentes en el GBM y las células del sistema inmunitario, lo que indicaría que se desarrolló rechazo inmunitario por parte del animal hacia las células tumorales.

Adicionalmente a los anticuerpos, se utilizó el marcador nuclear HOECHST que evidenció la gran cantidad de núcleos grandes, agrupados y heterogéneos correspondientes al tumor, lo que se corresponde con los resultados de la tinción de Hematoxilina/Eosina. El marcaje procedente de la carbocianina DiD que da lugar a una señal roja se encontró también en la masa del tumor pero tendiendo a presentar más intensidad en el centro del tumor, donde presumiblemente se encontrarían las células que se han dividido menos durante el desarrollo del tumor.

Como se explicó en Materiales y métodos, la **GFAP** es una proteína que se expresa específicamente en las células de la glia y de algunos tipos de GBM al proceder el cáncer inicialmente de estas células. En primer lugar, se utilizó primero el anticuerpo MO761 de Dako sobre un corte perteneciente al tumor de la Rata 2 que arrojaba un resultado dudoso, ya que el marcaje aparecía exactamente en las mismas zonas que el marcaje de los núcleos (no mostrado), por lo que se utilizó en un segundo experimento otro diferente, el G9269 de Sigma sobre una muestra perteneciente a la Rata 1.

En el caso del segundo anticuerpo utilizado, se pudo identificar la falta de marcaje inmunohistoquímico en la zona del tumor con respecto al resto de tejido cerebral circundante. Sin embargo, se pudo encontrar en zona central la aparición de un marcaje leve que puede tener diversos orígenes.

En el experimento realizado contra la proteína **CD31** sobre una muestra de la Rata 2 que como se explicó en Materiales y métodos se expresa en células en proliferación además de en algunos leucocitos, se pudo determinar el marcaje de algunas células en el interior del tumor (**Figura 12**). Sin embargo, no se encontraron suficientes eventos de colocalización de las células con el marcaje de CD31 con las células de U87 teñidas inicialmente con la carbocianina DiD, por lo que no se puede afirmar que las células del tumor presenten este marcaje.

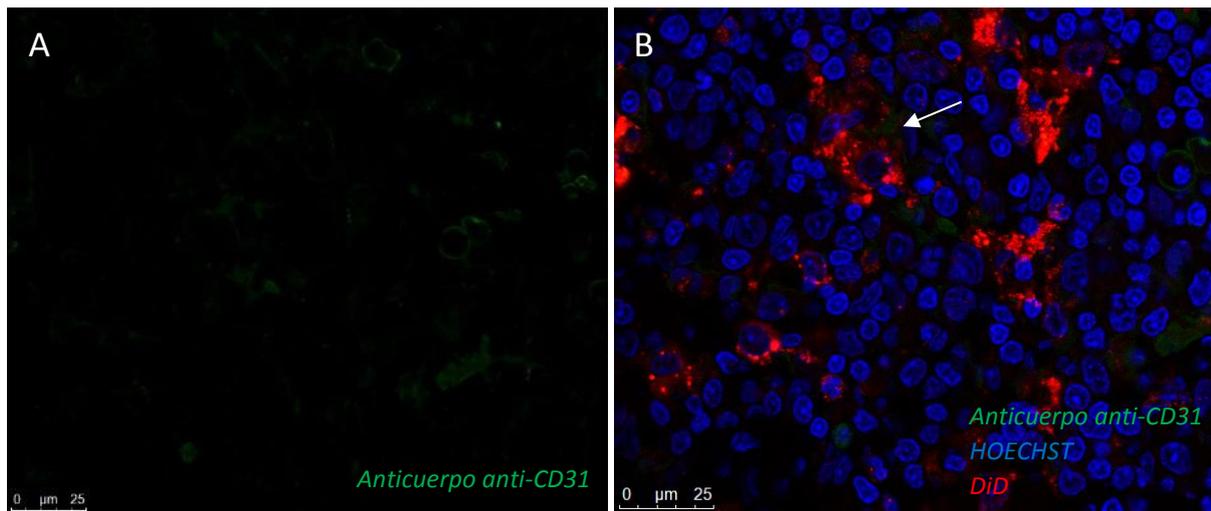
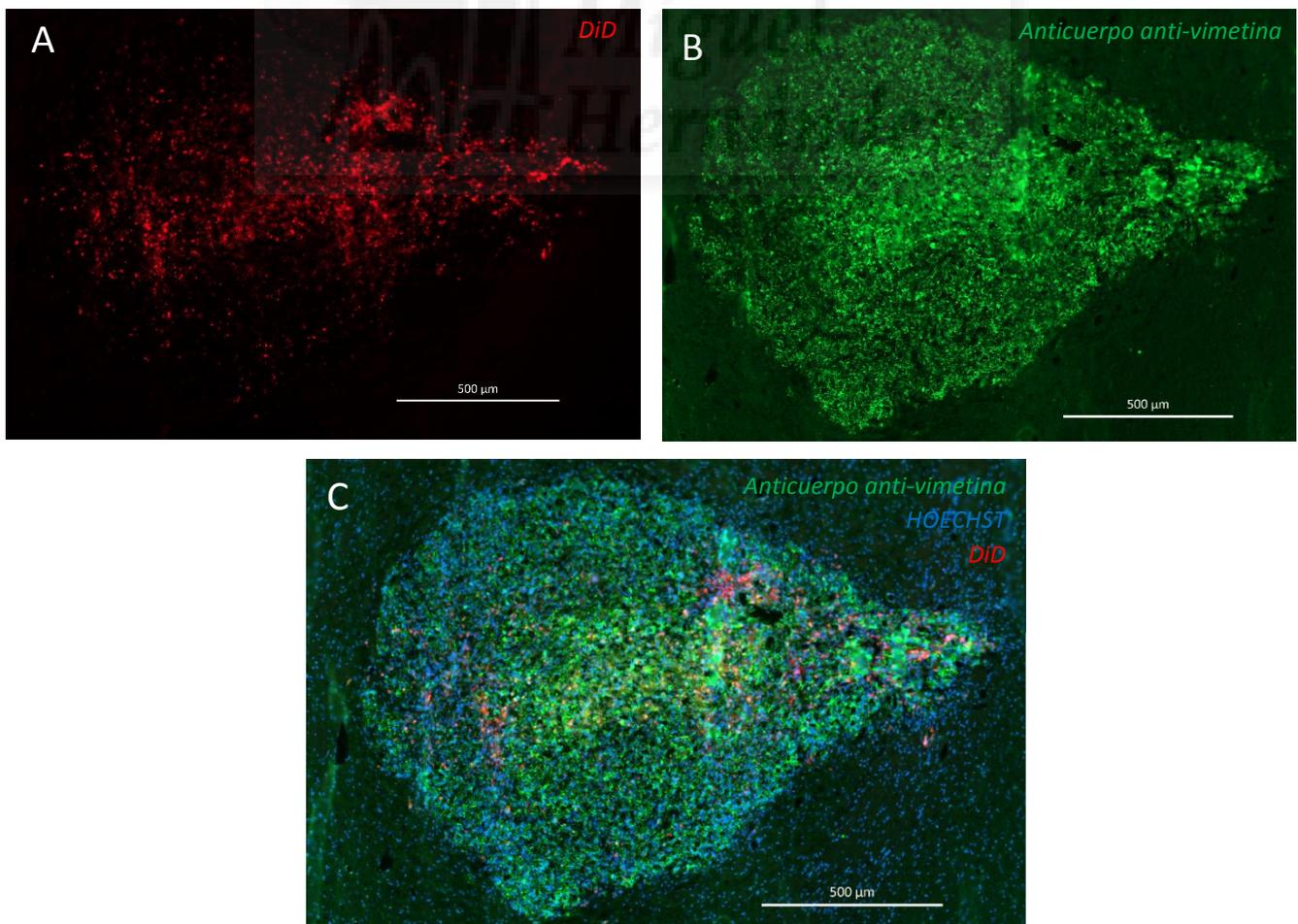


Figura 12. Imágenes a 400 aumentos tomadas en un microscopio apotome, en las que se aprecia los núcleos celulares marcados en azul (HOECHST), las células tumorales en rojo (DiD) y el CD31 en verde (anticuerpo anti-CD31). Se pueden observar solo un evento de colocalización de la indocianina DiD y el anticuerpo anti-CD31 (flecha)

En cuanto a la **vimetina**, es un marcador tumoral por lo que el anticuerpo marcó de forma intensa toda la masa del tumor de la Rata 1 (**Figura 13 A, B y C**). Además, se observó colocalización de la vimetina con la carbocianina DiD (**Figura 13 D, E y F**), lo que valida que las células marcadas con DiD desarrollan un fenotipo tumoral.



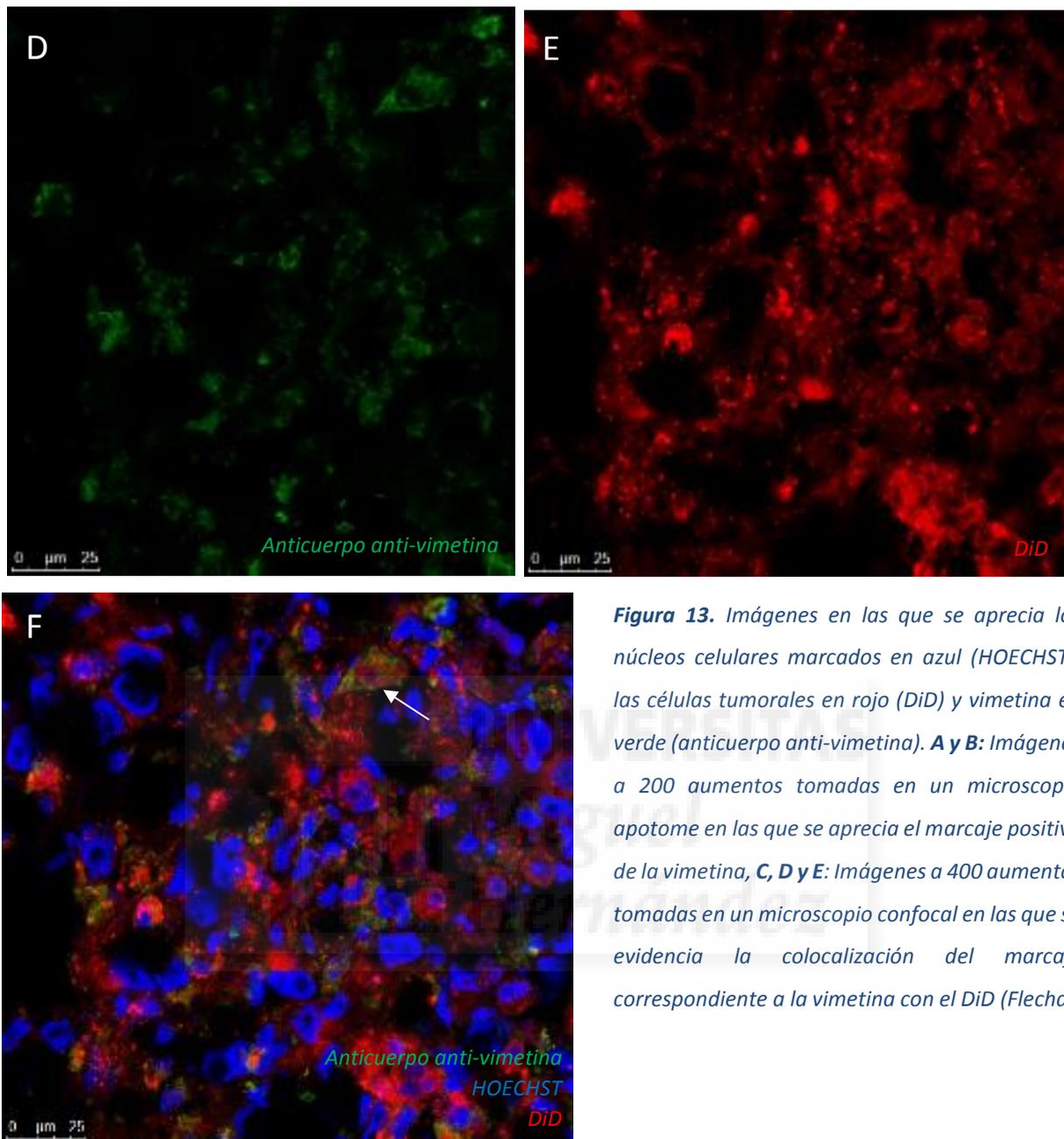


Figura 13. Imágenes en las que se aprecia los núcleos celulares marcados en azul (HOECHST), las células tumorales en rojo (DiD) y vimentina en verde (anticuerpo anti-vimetina). **A y B:** Imágenes a 200 aumentos tomadas en un microscopio apotome en las que se aprecia el marcaje positivo de la vimentina, **C, D y E:** Imágenes a 400 aumentos tomadas en un microscopio confocal en las que se evidencia la colocalización del marcaje correspondiente a la vimentina con el DiD (Flecha).

En referencia a **VEGF**, proteína implicada en angiogénesis, se observa un número reducido de células marcadas en la Rata 2, con lo es difícil determinar que el tumor del modelo la expresa esta proteína. Adicionalmente, no se observa ningún caso de colocalización con las células de U87 marcadas con carbocianina DiD en la muestra analizada (Imágenes no mostradas).

En lo que respecta a **IBA1**, el marcador de microglia activada, se encuentra marcaje (**Figura 14 A y C**) además de colocalización con DiD en la Rata 1 (**Figura 14 D y E**), por lo que se comprueba que las células tumorales por su inestabilidad genómica han sido capaces de expresar este marcador.

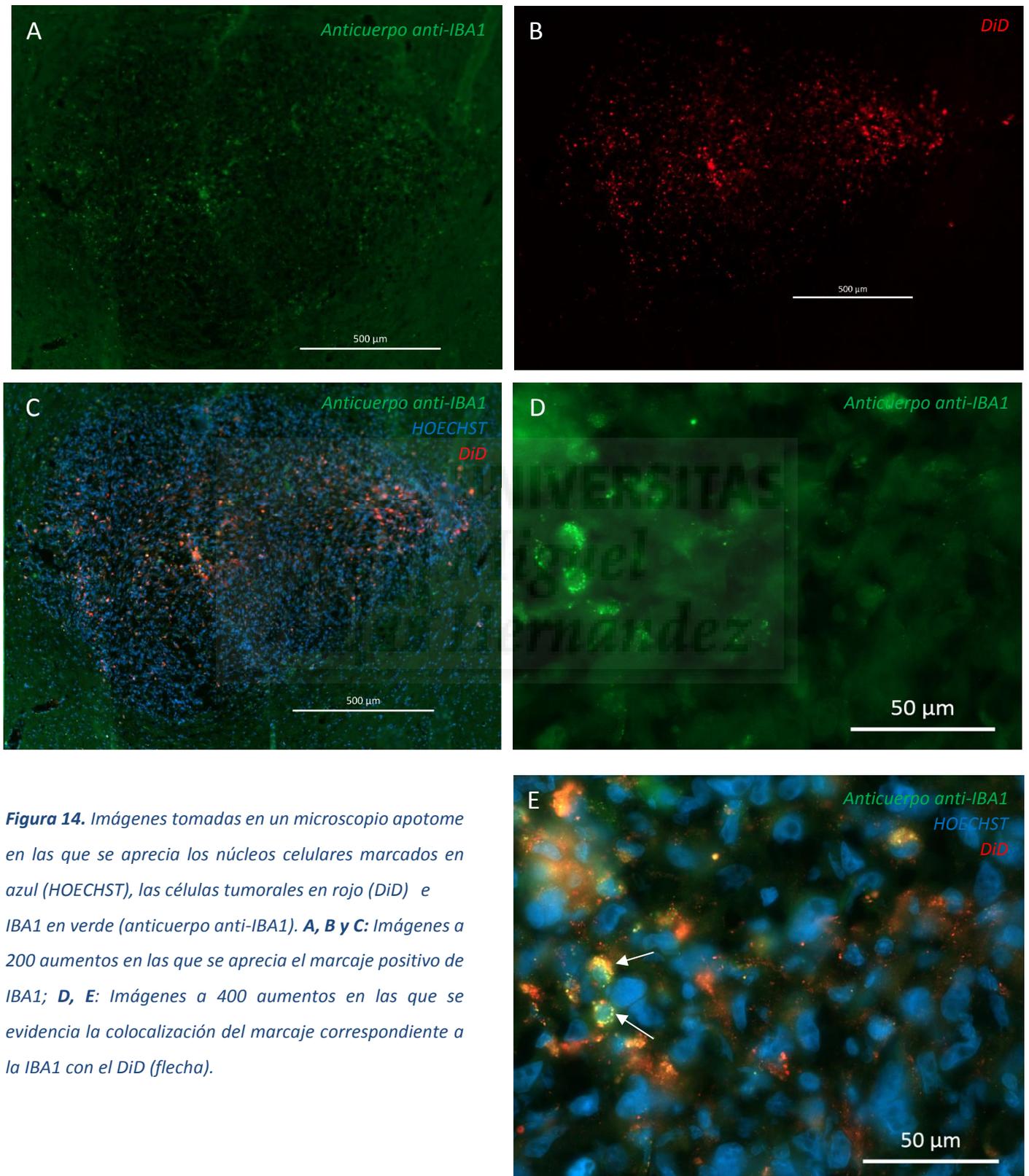


Figura 14. Imágenes tomadas en un microscopio apotome en las que se aprecia los núcleos celulares marcados en azul (HOECHST), las células tumorales en rojo (DiD) e IBA1 en verde (anticuerpo anti-IBA1). **A, B y C:** Imágenes a 200 aumentos en las que se aprecia el marcaje positivo de IBA1; **D, E:** Imágenes a 400 aumentos en las que se evidencia la colocalización del marcaje correspondiente a la IBA1 con el DiD (flecha).

5. DISCUSIÓN

Para comenzar, se eligió la línea celular U87 para desarrollar el modelo de la enfermedad porque desarrollaba características similares al cáncer a estudio en el interior de un animal dando lugar a una masa tumoral con un patrón difuso infiltrativo [31,36] y de la que además se encontraron numerosos ejemplos de xenoinjerto con U87 en la bibliografía [35].

Sobre esta línea, se ensayó el método de marcaje celular con la carbocianina DiD. La condición experimental en la que la tinción se aplica durante 15 minutos y el número de células iniciales por placa es $5 \cdot 10^5$, resultó ser la más favorable en vista de los datos obtenidos al poseer un nivel de fluorescencia y proporción de células fluorescentes superior al resto de condiciones en un mismo tiempo.

Los datos parecen apuntar a que el decaimiento de la fluorescencia depende de las condiciones iniciales de densidad celular y tiempo de tinción, por lo que sería factible elaborar un modelo robusto que sirviera para predecir la proporción de células con fluorescencia y su intensidad durante su desarrollo tras la realización de ensayos adicionales que no se contemplaban en este trabajo debido a su mayor duración, además de que se salen del objetivo principal de este.

Tras implantar las células U87 en el animal, el modelo del GBM se desarrolló satisfactoriamente pues se pudo reproducir el fenotipo del tumor sobre todo en cuanto a heterogeneidad y alta densidad celular. La utilización de la carbocianina fluorescente DiD sirvió para determinar las células tumorales. Sin embargo, no se utilizó para determinar el tamaño del tumor por la aparición de células que en las tinciones con Hematoxilina/Eosina se identificaron como tumorales que no poseían fluorescencia de la carbocianina. Se encontró un mayor número de células sin fluorescencia en el tumor de 14 días de crecimiento, ya que las células se habían dividido en mayor cantidad que el tumor de 6 días de desarrollo, que habían perdido la casi en su totalidad la fluorescencia. Otro aspecto que dificultó la utilización de la carbocianina como método de detección del tumor fue la observación de células marcadas fuera de la masa principal del tumor radiando hacia zonas más apartadas del cerebro. Este fenómeno puede tener su origen en el patrón de crecimiento infiltrativo del GBM, pero serían necesarias pruebas adicionales para confirmarlo.

En cuanto al desarrollo del tumor, fue el adecuado en los dos animales utilizados al ir aumentando su volumen en función del tiempo e ir adquiriendo las características típicas del GBM según confirmaba la inmunohistoquímica. La prueba para el marcador tumoral vimetina fue positiva, de igual modo que en el GBM clínico [35] Lo cual indica que las células del GBM que se ha desarrollado en la Rata 1 desarrollaron un fenotipo tumoral. Además la intensa colocalización con DiD y su

distribución por todo el tumor sugieren que podría utilizarse como herramienta para identificar el tamaño y disposición del tumor.

Dado que la bibliografía es contradictoria con respecto a la expresión de GFAP por la línea tumoral U87, según la cual algunos autores describen expresión [52,53] y otros ausencia de expresión de esta proteína [54], decidimos comprobarlo experimentalmente en nuestro modelo. Apareció solo un ligero marcaje en la zona central del tumor, una zona de enorme densidad celular por lo que posiblemente durante el desarrollo del tumor pudo desarrollar hipoxia alterando el fenotipo de las células dando lugar a este marcaje.

En cuanto a CD31, marcador típico de células en proliferación, plaquetas y algunos leucocitos [50], se determinó su presencia en el interior del tumor, pero sin colocalizar con la carbocianina DiD; esto podría tener su razón en que al haberse utilizado el tumor de la Rata 2 que se ha dividido mucho más, pudiendo haber perdido más fluorescencia que el tumor de la Rata 1, disminuyendo las posibilidades de colocalización en general de cualquier marcador.

Por otro lado, el marcador VEGF, que está implicado en angiogénesis, tuvo un resultado negativo debido a que pudo no expresarse en el tumor o bien que la técnica necesite de una puesta a punto que los tiempos del trabajo no permitieron, por lo que se deberá revisar en el futuro. La no expresión de esta proteína podría apuntar a que el tumor desarrollado en la Rata 2 no presenta angiogénesis. Se ha visto que este antígeno no empieza a sobreexpresarse en el GBM clínico hasta fases más avanzadas de desarrollo del tumor [28], con lo cual en los tiempos del experimento el tumor podría no haber empezado a desarrollar angiogénesis, pero para confirmar este hecho habría que repetir el experimento utilizando marcadores de angiogénesis adicionales. El GBM se caracteriza por desarrollar una angiogénesis tal que le permite desarrollarse, pero para poder modelizar este hecho, se deberían aumentar los tiempos de desarrollo del tumor. Este aumento podría no ser viable desde el punto de vista ético, ya que significaría aumentar el tiempo en el que el animal se encuentra padeciendo la enfermedad. Para el marcador de microglía activada IBA1, el resultado fue positivo lo que concuerda con el origen glial de las células del GBM. Las células localizadas con este marcador colocalizando con la carbocianina DiD indican la enorme desregulación proteica en las células tumorales que les confiere la sobreexpresión de este antígeno. De todos los antígenos estudiados en las pruebas inmunohistoquímicas, la vimentina dio lugar a un marcaje más intenso por lo que es susceptible de utilizarse como método de detección del tumor.

Las condiciones utilizadas han resultado favorables al haber conseguido dar lugar a un tumor capaz de desarrollarse en el interior del animal, reproduciendo una gran cantidad de características

del tumor clínico por lo que serán aplicables en posteriores estudios farmacológicos o de la biología del cáncer.

6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

6.1 CONCLUSIONES

- Las condiciones experimentales de 15 minutos de tinción con DiD y $5 \cdot 10^5$ número de células iniciales por placa resultaron las más favorables para aumentar la intensidad y proporción de células con fluorescencia a lo largo del tiempo.
- Se consiguió desarrollar el tumor en el tejido cerebral de la rata reproduciendo sus características moleculares.
- La tinción de Hematoxilina/Eosina resultó una herramienta eficaz para el seguimiento del tamaño del tumor al menos hasta el día 14.
- La vimentina demostró ser una herramienta adecuada para el seguimiento del tamaño del tumor al menos hasta el día 6.
- La tinción con la carbocianina DiD de las células U87 no pudo utilizarse como método principal para la determinación del tamaño del tumor y la discriminación entre células tumorales y sanas en las etapas más avanzadas de su desarrollo.

6.2 PROYECCIÓN FUTURA

Los datos de fluorescencia de la carbocianina DiD en los cultivos celulares de U87 apuntan a que modificando las condiciones iniciales de tiempo de tinción y densidad celular es posible aumentar la vida de la fluorescencia tanto en número de células fluorescentes como en intensidad de fluorescencia, por lo que si se realizaran más ensayos que pudieran dar lugar a un modelo matemático de predicción robusto, se podría utilizar como método para la determinación de la progresión de las células.

Los parámetros experimentales utilizados en el desarrollo del modelo animal de GBM serán aplicables a futuros modelos de esta enfermedad lo que permitirá realizar estudios tanto de la biología del tumor como de fármacos contra este, en concreto, se utilizarán en la validación preclínica de un fármaco derivado de la camptotecina que se está estudiando en el laboratorio del Dr. Eduardo Fernandez. Debido a la gravedad de la enfermedad y a la falta de tratamientos efectivos contra esta, cualquier avance en su tratamiento tendrá un gran impacto en el bienestar y la esperanza de vida de los pacientes.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Ricardo Paniagua. *Biología celular*. Editorial McGraw-Hill-Interamericana, 3ª ed.
2. Louis, D. N. *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* **114**, 97–109 (2007).
3. Dolecek, T. A., Propp, J. M., Stroup, N. E. & Kruchko, C. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2005–2009. *Neuro-Oncology* **14**, v1–v49 (2012).
4. Preusser, M. *et al.* Current concepts and management of glioblastoma. *Ann. Neurol.* **70**, 9–21 (2011).
5. Wen, P. Y. & Kesari, S. Malignant gliomas in Adults. *N. Engl. J. Med.* **359**, 492–507 (2008).
6. Nakada, M. *et al.* Aberrant signaling pathways in Glioma. *Cancers (Basel)*. **3**, 3242–3278 (2011).
7. Omuro, A. Glioblastoma and Other Malignant Gliomas. *Jama* **310**, 1842 (2013).
8. Fadoo, A. *et al.* Understanding the role of tumor stem cells in glioblastoma multiforme: A review article. *J. Neurooncol.* **103**, 397–408 (2011).
9. Kang, M.-K. & Kang, S.-K. Tumorigenesis of chemotherapeutic drug-resistant cancer stem-like cells in brain glioma. *Stem Cells Dev.* **16**, 837–847 (2007).
10. Ohgaki, H. & Kleihues, P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin. Cancer Res.* **19**, 764–772 (2013).
11. Wrensch, M., Minn, Y., Chew, T., Bondy, M., & Berger, M. S. (2002). Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro Oncol* **4**, 278–299
12. Gu, J., Liu, Y., Kyritsis, A. P. & Bondy, M. L. Epidemiology of Primary Brain Tumors. *Neurother.* **VO - 6**, 427 (2009).
13. Bush, N. A. O., Chang, S. M. & Berger, M. S. Current and future strategies for treatment of glioma. *Neurosurg. Rev.* 1–14 (2016).
14. Instituto Nacional del cáncer. Escala de rendimiento de Karnofsky. *Diccionario de cáncer* Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario?cdrid=44156>.
15. Organización Mundial de la Salud OMS. *Medición de la salud y la discapacidad. Manual para el Cuestionario de Evaluación de la Discapacidad de la OMS.* (2010).
16. Stupp, R. *et al.* Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* **10**, 459–466 (2009).
17. Sherr, C. J. & Roberts, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* **13**, 1501–1512 (1999).
18. Semenza, G. L. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* **29**, 625–634 (2009).
19. Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D. & Keshet, E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* **359**, 843–845 (1992).
20. Jeffrey N Bruce. Glioblastoma Multiforme. *Medscape*.
Disponible en: <http://emedicine.medscape.com/article/283252-overview>.

21. Fernández Lovera, D. C. PET. *Medicina Nuclear*.
Disponible en: http://www.medicinanuclear.cl/pet_indice.htm.
22. Krings, T. *et al.* Functional MRI and 18F FDG-positron emission tomography for presurgical planning: Comparison with electrical cortical stimulation. *Acta Neurochir. (Wien)*. **144**, 889–899 (2002).
23. Pirzkall, A. *et al.* MR-spectroscopy guided target delineation for high-grade gliomas. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **50**, 915–928 (2001).
24. Radiological Society of North America. Introducción a la terapia para el cáncer (radioterapia). *RadiologyInfo.org*
Disponible en: http://www.radiologyinfo.org/sp/info.cfm?pg=intro_onco
25. Hegi. *et al.* Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. 997–1003 (2005).
26. Gilbert, M. R. *et al.* A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **370**, 699–708 (2014).
27. Chamberlain, M. C. Bevacizumab for the treatment of recurrent glioblastoma. *Clin. Med. Insights Oncol.* **5**, 117–129 (2011).
28. Alifieris, C. & Trafalis, D. T. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacol. Ther.* **152**, 63–82 (2015).
29. Wick, A. *et al.* Rechallenge with temozolomide in patients with recurrent gliomas. *J. Neurol.* **256**, 734–741 (2009).
30. Hegi, M. E. *et al.* Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J. Clin. Oncol.* **26**, 4189–4199 (2008).
31. Stylli, S. S., Luwor, R. B., Ware, T. M. B., Tan, F. & Kaye, A. H. Mouse models of glioma. *J. Clin. Neurosci.* **22**, 619–626 (2015).
32. Barth, R. F. & 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.* **94**, 299–312 (2009).
33. Kruse, C. A. *et al.* A rat glioma model, CNS-1, with invasive characteristics similar to those of human gliomas: A comparison to 9L gliosarcoma. *J. Neurooncol.* **22**, 191–200 (1994).
34. Candolfi, M. *et al.* Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: Neuropathological
35. Morris, E. J. Topoisomerase-I : Evidence for Cell Cycle-independent Toxicity. **134**, 757–770 (1996).
36. Radaelli, E. *et al.* Immunohistopathological and neuroimaging characterization of murine orthotopic xenograft models of glioblastoma multiforme recapitulating the most salient features of human disease. *Histol. Histopathol.* **24**, 879–891 (2009).
37. Gravier, J. *et al.* Lipidots: competitive organic alternative to quantum dots for in vivo fluorescence imaging. *J. Biomed. Opt.* **16**, 096013 (2011).
38. Yumoto, K., Berry, J. E., Taichman, R. S. & Shiozawa, Y. A novel method for monitoring tumor proliferation in vivo using fluorescent dye DiD. *Cytometry. A* **85**, 548–55 (2014).
39. Sabnis, D. R. W. *Handbook of Biological Dyes and Stains: Synthesis and Industrial Applications*. (John Wiley & Sons, 2010).

40. Darby, T. D. H. and I. A. *Histology Protocols*. (Humana Press, 2010). Part 1: Tissue Processing. Chapter 1, Tissue Preparation for Histochemistry: Fixation, Embedding and Antigen Retrieval for Light Microscopy. (págs. 3-18)
41. Cordes, T., Maiser, A., Steinhauer, C., Schermelleh, L. & Tinnefeld, P. Mechanisms and advancement of antifading agents for fluorescence microscopy and single-molecule spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**, 6699–6709 (2011).
42. Thermo Fisher. Fluorescence SpectraViewer. *thermofisher.com*
 Disponible en: <http://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>
43. Reardon, D. A. *et al.* Glioblastoma Eradication Following Immune Checkpoint Blockade in an Orthotopic, Immunocompetent Model. *Cancer Immunol. Res.* **4**, 1–12 (2015).
44. George Paxinos, Charles Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 4th edicion* (Academic Press, 1997)
45. Ait-Belkacem, R. *et al.* Monitoring therapeutic monoclonal antibodies in brain tumor. *MAbs* **6**, 1385–1393 (2014).
46. Barone, A. *et al.* Combined VEGF and CXCR4 antagonism targets the GBM stem cell population and synergistically improves survival in an intracranial mouse model of glioblastoma. *Oncotarget* **5**, 9811–22 (2014).
47. Doblas, S. *et al.* In vivo characterization of several rodent glioma models by 1H MRS. *NMR Biomed.* **25**, 685–694 (2012).
48. Hughes, B.O. *Behaviors as an index of welfare*. Proc. V. European Poult, Conf., Malta, 1005-1014. (1976).
49. Langford, D. J. *et al.* Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat Methods* **7**, 447–449 (2010).
50. Komori, T. Pathology and Genetics of Diffuse Gliomas in Adults. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*. **55 Suppl 1**, 28–37 (2015).
51. He, H. U., Niu, C. S. H. I. & Li, M. W. U. Correlation between glioblastoma stem-like cells and tumor vascularization. 45–50 (2012).
52. Ehg, J. E. E. R., Ush, D. O. B. & Ard, J. E. M. W. Continuing Education CE3 - Histopathology of the Rodent Lymphoid and Hematopoietic Systems The Utility of Immunohistochemistry for the Identification of Hematopoietic and Lymphoid Cells in Normal Tissues and Interpretation of Proliferative and Inflammator. 345–374 (2012).
53. Belot, N. *et al.* Molecular characterization of cell substratum attachments in human glial tumors relates to prognostic features. *Glia* **36**, 375–390 (2001).
54. Yu, S.-C. *et al.* Isolation and characterization of cancer stem cells from a human glioblastoma cell line U87. *Cancer Lett.* **265**, 124–134 (2008).
55. Restrepo, A. *et al.* Epigenetic regulation of glial fibrillary acidic protein by DNA methylation in human malignant gliomas. **13**, 42–50 (2011).

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer al profesor Eduardo Fernández el darme la oportunidad de colaborar en su laboratorio durante este año en el que he podido aprender muchísimas cosas e impregnarme de cómo funciona este trabajo. Este aprendizaje y experiencia ha sido posible gracias al gran trabajo y dedicación de Elisa Checa, que ha estado tutelándome durante todo el proceso, por lo que me gustaría dedicarle un agradecimiento especial. También ha empleado mucho tiempo y trabajo en mí Cristina Soto de la que he aprendido muchas cosas y a la que me gustaría parecerme en el futuro profesionalmente hablando.

También es importante y muy merecido que agradezca la predisposición desde el primer día hasta el último de todos los integrantes de la Unidad de neuroprótesis y rehabilitación visual del Instituto de Neurociencia de Elche, que me han ayudado mucho y además han conseguido que la experiencia sea muy agradable y satisfactoria. Entre ellos quiero resaltar la colaboración de Sonia Andreu, Antonio Alarcón, Javier Alegre, Gema Martínez, Juan Manuel Morcillo, Santiago Milla, Yaiza Maestre, Desiré González, Miguel Sánchez y Lawrence Humphreys sin los cuales este trabajo no hubiera sido posible. Además, doy las gracias Ainoa Gallego y Javier Navarro por echarme un cable con algunos aspectos del trabajo que de otra manera no se hubieran podido llevar a cabo.

