

**ANÁLISIS DE LA INESTABILIDAD CROMOSÓMICA Y DE LA HETEROGENEIDAD
DE LAS CÉLULAS INICIADORAS DE GLIOBLASTOMAS HUMANOS.**

Programa de Doctorado en Medicina Molecular Aplicada.

Universidad: San Pablo Ceu



TRABAJO REALIZADO POR LA
LCDA ESTHER HOLGADO MARTÍN
PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA.

Directores de Tesis y afiliaciones

Dr. Angel Ayuso Sacido
Fundación Hospital de Madrid

Dr. Cristobal Belda Iniesta
Fundación Hospital de Madrid

ÍNDICE

1. Agradecimientos
2. Abreviaturas
3. Introducción
 - 3.1. Epidemiología de gliomas malignos
 - 3.1.1. Incidencia
 - 3.1.2. Mortalidad
 - 3.1.3. Factores de riesgo
 - 3.2. Manejo clínico de gliomas malignos
 - 3.2.1. Presentación clínica
 - 3.2.2. Diagnóstico
 - 3.2.3. Tratamiento
 - 3.3. Biología molecular de gliomas malignos
 - 3.3.1. Alteraciones moleculares y cromosómicas frecuentes
 - 3.3.2. Clasificación basada en técnicas ómicas
 - 3.4. Biología de células iniciadoras de gliomas malignos
4. Objetivos
5. Materiales y métodos
 - 5.1. Justificación del número de cultivos primarios obtenidos
 - 5.2. Selección de pacientes
 - 5.2.1. Criterios de Inclusión
 - 5.2.1. Criterios de exclusión
 - 5.3. Aislamiento, derivación y expansión de CITs
 - 5.4. Análisis morfológico de esferas tumorales
 - 5.4.1. Estudio de cortes semifinos
 - 5.4.2. Estudio de cortes ultrafinos por MET
 - 5.4.3. Estudio de la superficie mediante MES
 - 5.5. Ensayos de diferenciación
 - 5.6. Inmunocitoquímica e inmunohistoquímica
 - 5.7. RT-PCR y QRT-PCR

5.8. CGHs

5.9. Ensayos de viabilidad mediante MTS

5.10. Procedimientos estadísticos

6. Resultados

6.1. Aislamiento, derivación y expansión de CITs de muestras quirúrgicas de pacientes con gliomas de alto grado.

6.2. Caracterización morfológica de los diferentes cultivos primarios de CITs de gliomas de alto grado.

6.2.1. Caracterización morfológica I: cortes semifinos (TLM)

6.2.2. Caracterización morfológica II: cortes ultrafinos (TEM)

6.2.3. Caracterización morfológica III: esferas (SEM)

6.3. Expansión de CITs y toma de muestras para la realización de análisis comparativo en relación al número de pases en cultivo.

6.4. Análisis comparativo de proliferación en relación al número de pases en cultivo

6.5. Caracterización morfológica de los diferentes cultivos primarios de CITs de gliomas de alto grado en relación con el número de pases en cultivo.

6.6. Descripción del grado de diseminación de CITs xeno-implantadas en cerebro de animales de experimentación: evaluación de posibles diferencias en el patrón de diseminación en relación con el número de pases en cultivo.

6.7. Estudio comparativo de la morfología celular de los diferentes cultivos primarios de CITs de gliomas de alto grado en relación con el número de pases en cultivo.

6.8. Evaluación de la expresión de genes relacionados con estados de diferenciación e indiferenciación en relación con el número de pases en cultivo.

6.9. Detección y análisis de alteraciones cromosómicas en relación con el número de pases en cultivo.

6.10 Análisis de la sensibilidad de CITs a fármacos de uso común en el tratamiento de diferentes tipos de tumores en relación con el número de pases en cultivo.

7. Discusión

8. Conclusiones

9. Bibliografía

10. Anexo

AGRADECIMIENTOS

Con la dificultad que este apartado añade a la elaboración y escritura de todo el trabajo de estos años, y sabiendo que son muchas las personas importantes en mi vida, quiero expresar de forma general mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que durante estos años han estado a mi lado, profesores, compañeros, amigos y familia que de una u otra forma han contribuido a que esta tesis haya llegado a su mejor fin.

Quiero agradecer en primer lugar al Dr. Belda Iniesta su inestimable valor y esfuerzo como mentor en todos estos años. Han sido incontables horas como guía profesional y científico, y ha sido quien me ha dirigido en este extenso trabajo con la mayor paciencia y total disponibilidad. Gracias por todo lo que he aprendido trabajando junto a él y por haber sido compañero y guía indiscutible de mis primeros pasos en la investigación oncológica.

Gracias al Dr. Ayuso Sacido por sus enseñanzas y horas de trabajo conjunto en la realización de los experimentos que se describen en esta tesis, un mundo totalmente desconocido para mi, que ha requerido de su mayor habilidad y esfuerzo en la enseñanza de los fundamentos de las técnicas en cultivos celulares, genómica, diseños experimentales y en general, del método científico que en este trabajo se describen. Sólo puedo expresar mi más inmensa gratitud a quien desde el principio me ha aceptado en su laboratorio y descubierto la ciencia y su metodología como elemento para el entendimiento de la fisiopatología del cáncer en mi práctica clínica como oncóloga.

A los amigos y personas de valor que han sabido disculpar mis ausencias y que siempre han tenido una palabra de ánimo. Estoy absolutamente convencida de que gracias a todos ellos soy una persona aún más afortunada, y no tengo palabras para expresarles mi más absoluta gratitud por todos esos momentos en los que hemos destapado recuerdos, ideas y amor por nuestro trabajo.

Pero mi mayor agradecimiento se lo debo a mi familia, por apoyarme en todas las decisiones que he tomado a lo largo de la vida, por haber vivido día a

día y desde mi más tierna infancia, la tenacidad y el esfuerzo diario del profesional que no cesa en su lucha contra el cáncer, y es por esto que le agradezco al Dr. Javier Holgado, mi padre y amigo, enseñarme a luchar sin descanso.

Por último, quiero agradecerle a la persona más importante de mi vida, a Alex, mi hijo, su amor, a pesar de la multitud de horas robadas por este trabajo, por compartir embarazo, biberones y horas y horas de cuentos y páginas de esta tesis, con la mejor de las sonrisas, y darme el mejor ejemplo de aprendizaje y superación diaria.

Gracias a todos los que habéis hecho realidad esta Tesis Doctoral.

ABREVIATURAS

AA: Astrocitoma Anaplásico

ATP: Adenosina Trifosfato

ATPO: Adenosín Trifosfato

CGH: Hibridación genómica comparativa

CITs: Células iniciadoras de tumores

DAB: Diamoni-bencidina

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EORTC: European Organization for Research and Treatment of Cancer

FBS: Suero fetal bobino

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

GBM: Glioblastoma multiforme

HBSS: Hanks Balanced Salt Solution

HIF: Factor inducible por hipoxia

HR: Hazard ratio

ICD: International Classification of Diseases

IDH: Isocitrato Dehidrogenasa

IGF: Factor de crecimiento insulínico

LCR: Líquido cefalorraquídeo

Mes: Mesenquimal

MO: Microscopio óptico

MTT: 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil bromuro de tetrazolio

ODG: Oligodendroglioma

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PET: Tomografía por emisión de positrones

PN: Proneural

Prolif: Proliferativo

QRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

RB: Retinoblastoma

RNM: Resonancia Nuclear Magnética

RTOG: Radiation Therapy Oncology Group

RPA: Recursive Partitioning Analysis

SEM: Scanning Electron Microscope

SNC: Sistema Nervioso Central

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

SG: Supervivencia Global

SLP: Supervivencia libre de progresión

SPECT: Single photon emission computed tomography (tomografía
computerizada de emisión monofotónica)

TAC: Tomografía Axial Computerizada

TEM: Microscopio electrónico de transmisión

TGF: Factor de crecimiento transformante beta

TMZ: Temozolamida

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

VIRUS JC: Virus Cunningham

WHO: Organización Mundial de la Salud

*. Todos los paneles, figuras y tablas se han adaptado a partir de figuras originales en inglés, o bien son parte del manuscrito elaborado con los resultados presentados en la presente Tesis Doctoral, por lo que también se muestran en Inglés.

INTRODUCCIÓN

3.1 Epidemiología de los gliomas malignos

Los gliomas constituyen un grupo muy heterogéneo de tumores neuroectodérmicos que, muy posiblemente, deriven de células neurogliales¹. De forma general, los astrocitomas son el subtipo más frecuente de gliomas (>70%) y, de forma específica, el Glioblastoma Multiforme (GBM) es el más frecuente de todos los astrocitomas (50%). Además, con cierta frecuencia, es posible que los neuropatólogos observen gliomas cuyas células son morfológicamente parecidas a los oligodendrocitos o, incluso, a los ependocitos y, por tanto, se les puede denominar oligodendrogliomas y ependimomas respectivamente. Estas características observables mediante microscopía óptica pueden provocar combinaciones de más de un tipo de células gliales, produciendo lo que se conocen como gliomas mixtos. Por ejemplo, un GBM oligodendrogliar sería un glioblastoma con componentes oligodendrogliales en su interior. Este tipo de combinaciones, más allá de la observación por el neuropatólogo, imprimen un pronóstico diferente en función del tipo de “mezcla” celular y del predominio de los diferentes componentes celulares².

Hoy día se emplean dos grandes tipos de clasificaciones para los gliomas. Por un lado, en la 3ª Edición de la clasificación internacional de enfermedades (ICD en sus siglas en inglés), dentro de su versión para oncología (conocida como ICD-O-3) (**Tabla1**), este tipo de tumores se categorizan en función de su histología³ y de su lugar de origen dentro de las diferentes áreas cerebrales (lóbulo frontal, parietal, occipital, izquierdo o derecho, etc). Por otro lado, la Organización Mundial de la Salud (WHO en sus siglas en inglés), desarrolló también una clasificación en la que los grados de los gliomas se organizaban en función de su pronóstico, evaluado éste a través de la supervivencia por historia natural⁴, cierto tipo de características tisulares y categorizado ordinalmente de I (mejor pronóstico) a IV (peor pronóstico). En este sentido, el GBM, o astrocitoma grado IV, es el tumor cerebral primario más agresivo en su evolución y con las características microscópicas más desfavorables en función del grado de atipia celular, la presencia de mitosis, la

hiperplasia vascular y la necrosis. Analizado de otra manera: la designación de grado IV se corresponde con neoplasias de crecimiento rápido, indiferenciadas, con áreas necróticas, con un número elevado de mitosis, presencia de hiperplasia vascular con crecimientos endoteliales de aspecto glomerular y con un pronóstico infausto que, generalmente, se mide en meses. Además, es una característica de los tumores gliales que todos los astrocitomas de grados inferior, a lo largo de su evolución, tienden a progresar hacia un grado superior. Recientemente se han añadido diversos tipos tumorales, algunos de los cuales se han descrito en función de alteraciones moleculares concretas (**Tabla 2**)⁵.

Tabla 1. Clasificación internacional de enfermedades, versión oncología (ICD-O-3)

Brain	
191.x	Malignant neoplasm of brain
191.0	Cerebrum, except lobes and ventricles
191.1	Frontal lobe
191.2	Temporal lobe
191.3	Parietal lobe
191.4	Occipital lobe
191.5	Ventricles
191.6	Cerebellum NOS
191.7	Brain stem
191.8	Other parts of brain
191.9	Brain, unspecified

3.1.1. Incidencia

En los adultos, los tumores malignos cerebrales primarios ocupan el 13º lugar en frecuencia de todos los cánceres, siendo las estadísticas norteamericanas y europeas muy similares. Dependiendo de la edad de la población estudiada, la incidencia anual de estas neoplasias oscila entre 4,8 y 10,6 por 100.000 habitantes. En España, se calcula una incidencia para los tumores malignos cerebrales primarios de 6,1 por 100.000 habitantes / año en hombres y 4,2 en mujeres⁶. Si analizamos la incidencia a 5 años en España los tumores cerebrales ocupan el 15º lugar siendo el tumor más frecuente el cáncer colorrectal.

Tabla 2. Clasificación WHO para los tumores cerebrales.

TUMOR GRADE	I	II	III	IV
Astrocytic tumors				
Subependymal giant cell astrocytoma	X			
Pilocytic astrocytoma	X			
Pilomyxoid astrocytoma		X		
Diffuse astrocytoma		X		
Pleomorphic xanthoastrocytoma		X		
Anaplastic astrocytoma			X	
Glioblastoma				X
Giant cell glioblastoma				X
Gliosarcoma				X
Oligodendroglial tumors				
Oligodendroglioma		X		
Anaplastic oligodendroglioma			X	
Oligoastrocytic tumors				
Oligoastrocytoma		X		
Anaplastic oligoastrocytoma			X	
Ependymal tumors				
Subependymoma	X			
Myxopapillary ependymoma	X			
Ependymoma		X		
Anaplastic ependymoma			X	
Choroid plexus tumors				
Choroid plexus papilloma	X			
Atypical choroid plexus papilloma		X		
Choroid plexus carcinoma			X	
Other neuroepithelial tumors				
Angiocentric glioma	X			
Chordoid glioma of the third ventricle		X		
Neuronal and mixed neuronal-glia tumors				
Gangliocytoma	X			
Ganglioglioma	X			
Anaplastic ganglioma			X	
Desmoplastic infantile astrocytoma and ganglioglioma	X			
Dysembryoplastic neuroepithelial tumor	X			
Central neurocytoma		X		
Extraventricular neurocytoma		X		
Cerebellar liponeurocytoma		X		
Paraganglioma of the spinal cord	X			
Papillary glioneuronal tumor	X			
Rosette-forming glioneuronal tumor of the fourth ventricle	X			
Pineal tumors				
Pineocytoma	X			
Pineal parenchymal tumor of intermediate differentiation		X	X	
Pineoblastoma				X
Papillary tumor of the pineal region		X	X	
Embryonal tumors				
Medulloblastoma				X
CNS primitive neuroectodermal tumor (PNET)				X
Atypical teratoid/rhabdoid tumor				X
Tumors of the cranial and paraspinal nerves				
Schwannoma	X			
Neurofibroma	X			
Perineurioma	X	X	X	
Malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST)		X	X	X
Meningeal tumors				
Meningioma	X			
Atypical meningioma		X		
Anaplastic/malignant meningioma			X	
Hemangiopericytoma		X		
Anaplastic hemangiopericytoma			X	
Hemangioblastoma	X			
Tumors of the sellar region				
Craniopharyngioma	X			
Granular cell tumor of the neurohypophysis	X			
Pituicytoma	X			
Spindle cell oncocytoma of the adenohypophysis	X			

Tal y como hemos indicado anteriormente, los gliomas representan el 31% de todos los tumores originados en el Sistema Nervioso Central (SNC) y el 81% de todos los tumores malignos cerebrales primarios. En el momento del diagnóstico inicial, el 54% de los gliomas son clasificados histológicamente como GBM, que constituye el tumor primario maligno más frecuente del SNC ⁷. Por ello, de forma global se puede decir que los gliomas son tumores poco frecuentes. Así se considera que 1 de cada 165 hombres o mujeres serán diagnosticados de un tumor cerebral a lo largo de su vida ⁸ y, hasta la fecha, nunca han formado parte de los 10 tumores más frecuentes del ser humano ⁹. Esto supone una tasa de incidencia que oscila entre 4 y 12 casos por 100.000 habitantes dependiendo del área geográfica estudiada. En este sentido, las diferencias geográficas en incidencia podrían sugerir que existe una etiología ambiental aunque nadie ha conseguido demostrarlo nunca. Por ejemplo, las tasas de incidencia de gliomas varían en función de la histología, la raza y el sexo. De forma general, cuando incluimos a la mayoría de los países de la UE, USA, Canadá y Australia se encuentran en 5 casos por 100.000 habitantes sin tener en cuenta el sexo. Por otro lado, las tasas ajustadas por edad e histología suponen para el glioblastoma 3,2 casos por 100.000 habitantes / año mientras que es menor de 0,2 para los oligodendrogliomas anaplásicos o para los astrocitomas protoplásmicos / fibrilares. De forma sostenida, las tasas para etnias caucásicas es mayor que para otras razas así como para hombres de forma independiente de la histología. Estos patrones geográficos, en muchas ocasiones vinculados a etnia, probablemente reflejan las posibilidades reales de acceso a los servicios médicos pues las tasas son mayores en países desarrollados que en el resto del mundo. Sin embargo, esta hipótesis es difícil de sostener cuando analizamos las incidencias en Corea del Sur o en Japón, cuyas tasas difícilmente superan los 2,5 casos por 100.000 habitantes ¹⁰. En relación con la edad, los gliomas, sobre todo los GBM, son más frecuentes a partir de los 55 años, teniendo un pico máximo alrededor de los 70 - 75 años.

En resumen, en el mundo occidental de forma general y en España particularmente, la incidencia de GBM está cercana a los 4 casos por 100.000 habitantes / año para los hombres, mientras que supera ligeramente los 2,5 casos en mujeres. Lamentablemente, no existen registros nacionales de tumores cerebrales ni, por tanto, de GBM en nuestro país, por lo que nos

regimos, para nuestros datos nacionales, por información obtenida comparativamente desde otros países de nuestro entorno así como desde esfuerzos muy meritorios realizados por diferentes provincias.

3.1.2. Mortalidad y supervivencia

Las tasas de mortalidad y, de forma consecuente, la supervivencia de los pacientes diagnosticados de tumores cerebrales, en su concepción histórica, están muy influenciadas por la disponibilidad de tecnologías diagnósticas por lo que es difícil contextualizar la evolución de este tipo de tumores. Por tanto, creemos que es razonable explorar series históricas a partir del momento en que el acceso a la RMN cerebral dejó de ser la principal causa de menor incidencia. Como este momento no es posible establecerlo como un punto determinado en el tiempo, de forma completamente arbitraria y a igualdad con otros autores, hemos considerado recorridos temporales para realizar comparaciones cuando ha sido necesario. En este sentido, los datos recientemente publicados por Crocetti *et al.*,⁷ demuestra que la supervivencia de los gliomas de alto grado a cinco años es del 4,9% sin tener en consideración el tratamiento recibido. Estos datos son congruentes con los pocos registros españoles de los que se disponen¹¹.

En cualquier caso, la supervivencia para la mayoría de los gliomas de alto grado es muy baja a pesar de los avances en cirugía, radioterapia y tratamientos médicos y de soporte, sobre todo cuando los comparamos con otros tipos tumorales¹². Se han descrito diversos factores asociados a un peor pronóstico incluyendo la localización tumoral (frontal, cerebelo y multilobular), el estatus socioeconómico y el sexo varón¹³. Pero son la edad, (**Tabla 3**) el grado de resección quirúrgica que se ha realizado y el estatus neurológico post-cirugía los factores que influyen más directamente en las posibilidades de supervivencia de cualquier paciente diagnosticado de un GBM, incluso en variaciones quirúrgicas que incluyen tecnologías de visualización avanzada¹⁴. En este sentido, las tasas de supervivencia para los pacientes con GBM de reciente diagnóstico se modifican por estos factores claramente por lo que no es posible hablar de supervivencia sin poner en contexto las diferentes características que tienen un influjo clave en la misma.

Tabla 3. Influencia de la edad de pacientes diagnosticados con GBM en la supervivencia.

Rango edad	Supervivencia			
	1 año (%) IC 95%	2 año (%) IC 95%	5 año (%) IC 95%	10 año (%) IC 95%
0-19	57,1 (51,3-62,5)	31,7 (26,3-37,3)	18,2 (13,6-23,3)	11,9 (7,5-17,3)
20-44	67,1 (65,1-68,9)	35,4 (33,5-37,4)	16,6 (15,0-18,3)	9,8 (8,1-11,6)
45-54	53,7 (5,2-55,2)	20,6 (19,4-21,9)	5,8 (5,0-6,7)	2,9 (2,0-3,9)
55-64	41,6 (40,4-42,8)	14,2 (13,3-15,1)	3,9 (3,4-4,6)	0,9 (0,4-1,9)
65-74	24 (22,9-25,1)	6,9 (6,2-7,6)	1,6 (1,2-2,1)	0,5 (0,2-1,2)
>75	9,7 (8,8-10,5)	2,6 (2,1-3,1)	0,8 (0,5-1,2)	-

Por ello, en 1998, el Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) publicó una clasificación que divide a los pacientes en diferentes grupos o clases según diversos factores pronósticos dando lugar a la llamada clasificación RPA (Recursive Partitioning Analysis). Dicha clasificación fue validada posteriormente por la European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) (**Tabla 4**) ¹⁵. Desde entonces es la única clasificación pronóstica validada.

La mediana de la supervivencia global (SG) de las clases III, IV y V fue de 17,8, 14,7, y 10,7 meses, con tasas de supervivencia global a 2 años del 26%, 12%, y 7%, respectivamente. Es cierto que se han descrito factores moleculares que matizan esta supervivencia pero que, por motivos académicos, hemos preferido describir a lo largo de los siguientes apartados.

En resumen, la supervivencia de un paciente diagnosticado de un GBM a los cinco años del diagnóstico es inferior al 5% por lo que la tasa de mortalidad alcanza casi el 100%. Sobre esta predicción influyen críticamente tres factores decisivos tales como la edad, el grado de resección y la sintomatología neurológica aunque estarán matizados por algunos factores moleculares, entre los que destaca el estatus de metilación del promotor de MGMT.

Tabla 4. Comparación de la clasificación pronóstica de RTOG y EORTC para los GBM.

CLASE RPA	RTOG [4]	EORTC [5]
III	Edad <50 KPS 90-100	Edad <50 PS 0
IV	Edad <50 KPS < 90	Edad <50 PS 1-2
	o Edad ≥50 Resección quirúrgica Buena función neurológica	o Edad ≥50 Resección parcial/completa MMS ≥27
V	Edad ≥50 KPS 70-100 Resección o sólo biopsia con radioterapia al menos 54,4Gy Función neurológica desfavorable	Edad ≥50 MMS <27 Biopsia
	o Edad ≥50 KPS <70 Función neurológica normal	

3.1.3. Factores de riesgo

Los principales factores de riesgo para el desarrollo de un glioma son la edad, el sexo varón y la raza caucásica ¹⁶. El único factor medioambiental o de estilo de vida conocido que predisponga al desarrollo de gliomas es la radiación ionizante. Todos los demás factores sólo pueden considerarse como sospechosos aunque jamás se han demostrado como tales en estudios con diseños mínimamente sólidos. Así el consumo de café, tabaco o alcohol, infecciones por virus, consumo de vitaminas o exposiciones industriales entre otros factores sospechosos, no pueden considerarse bajo ningún concepto epidemiológico como factores de riesgo para el desarrollo de gliomas ¹⁷⁻²²

Recientemente, diversos investigadores han centrado su atención sobre el uso de teléfonos móviles como factor de riesgo para el desarrollo de gliomas, producto de lo cual se han publicado dos grandes estudios epidemiológicos ²³. Sin embargo, la mayoría de los estudios epidemiológicos sobre este factor carecen del suficiente tiempo de seguimiento así como de datos que permitan

conocer la exposición individual y su estratificación en función de factores de riesgo genéticos ^{24,25} lo que ha producido estudios con escasa potencia ²³. Por otro lado, la mayoría de factores de riesgo (por ejemplo, el tabaquismo) precisó de décadas de exposición para observar una modificación de los patrones epidemiológicos. Este hecho en combinación con la realidad de que la tasa de incidencia de tumores cerebrales es estable desde hace un par de décadas, coincidentes con el momento en que el uso del teléfono móvil se globalizó, dificultan gravemente una asociación entre ambos parámetros ²⁶.

En otro orden de cosas, existen distintos estudios que han sugerido a diferentes enfermedades autoinmunes como la atopia o el asma como factores protectores para el desarrollo de este tipo de tumores. En cualquier caso, estos estudios hay que situarlos más allá de su vinculación estadística, concretamente dentro de los diferentes condicionantes inmunológicos y laborales que subyacen a aquellas patologías ^{27,28}.

Finalmente, la asociación entre enfermedades infecciosas y el desarrollo de gliomas se ha fundamentado en los hallazgos de secuencias de poliomavirus en células tumorales procedentes de gliomas humanos ²⁹. En este sentido, es ampliamente conocido el tropismo que este tipo de virus poseen por las células del sistema nervioso central ³⁰ así como el desarrollo de gliomas en monos tras la inoculación de los mismos con poliomavirus JC ³¹. Sin embargo, la dificultad de realizar infecciones interespecie con virus JC humanos ^{32,33} ha limitado el desarrollo de modelos que permitan sustentar de forma sólida la plausibilidad biológica de la observación inicial por lo que, como resultado, se ha producido una importante controversia epidemiológica sobre este aspecto ³⁴.

3.2. Manejo clínico de gliomas malignos

3.2.1. Presentación clínica, diagnóstico y tratamiento

El GBM se localiza preferentemente a nivel supratentorial, en la sustancia blanca subcortical de los hemisferios cerebrales. Es un tumor infiltrativo, sin márgenes claros que puede extenderse a través del cuerpo calloso al hemisferio contralateral. La localización en tronco cerebral es infrecuente en adultos pero es más habitual en niños. En cualquier caso, el cerebelo y la médula espinal son localizaciones inusuales ³⁵.

No existe ningún signo o síntoma específico clínicamente de un tumor cerebral maligno pues todos ellos son idénticos a cualquier patología cerebral que afecte a un territorio similar. Por tanto ante la aparición de cualquier síntoma o signo neurológico es obligado descartar un tumor cerebral dentro del proceso habitual de diagnóstico diferencial. En este sentido, se olvida con relativa frecuencia que las alteraciones campimétricas asociadas a los tumores cerebrales pueden ser los primeros signos que puede presentar un paciente por lo que ante la presencia de alteraciones visuales concretas se debe plantear siempre dentro del diagnóstico diferencial. De forma muy resumida, los síntomas asociados a la presencia de un tumor cerebral pueden ser por defecto o por exceso. En relación con estos últimos, los síntomas por exceso son las crisis comiciales. Así, cualquier paciente que presente una crisis comicial sin antecedentes previos de ningún tipo (fiebre, traumatismo, etc) debe ser evaluado para descartar la posibilidad de un tumor cerebral. Sin embargo, sólo el 6% de las crisis comiciales del adulto son directamente producidas por la presencia de un tumor cerebral. Los síntomas por defecto dependen del territorio cerebral afectado por el tumor y, generalmente, no siguen territorios vasculares. Por ejemplo, los tumores localizados en corteza frontal, que son los más frecuentes, pueden provocar alteraciones de la personalidad y abulia si afectan a las regiones anteriores de este lóbulo. Por el contrario, en regiones posteriores frontales, los tumores se asocian a alteraciones del habla y de la motilidad mientras que las afectaciones bilaterales pueden provocar modificación de la memoria, del ánimo e incontinencia urinaria. Los tumores localizados en lóbulo parietal producen unos síntomas que varían desde una incapacidad para la realización de un movimiento concreto hasta la paresia/plejía de un miembro completo así como alteraciones de la sensibilidad. La afasia es el síntoma principal en tumores localizados en lóbulo temporal dominante y las crisis comiciales son muy frecuentes. Además, pueden presentar alteraciones en la percepción tiempo/espacio y memoria así como alucinaciones auditivas. En los tumores localizados en lóbulo occipital las alteraciones visuales son la norma pudiendo observar alteraciones en la percepción del color, de las formas o cuadros extremos de ceguera cortical. Los síntomas asociados a la afectación talámica o por infiltración de la protuberancia o el bulbo generan síndromes complejos que escapan a la

intención de este trabajo. En cualquier caso, debemos recordar las funciones de cada territorio y los déficits que se pueden ocasionar en su desestructuración. Por último, muchos pacientes diagnosticados de tumores cerebrales malignos tendrán en algún momento un síndrome de hipertensión intracraneal. Este cuadro se caracteriza por tendencia al sueño, náuseas, vómitos en escopetazo, edema de mácula y, de forma característica, hipertensión y alteraciones del ritmo cardíaco. En niños este cuadro es de aparición más tardía pues la ausencia de fusión de las suturas craneales permite cierto grado de distensión, siendo el signo típico el abombamiento de las fontanelas. Sin embargo, esta capacidad de distensión no existe en el cráneo adulto por lo que la hipertensión intracraneal provoca desplazamiento precoz de las estructuras cerebrales que pueden terminar en una herniación de distintos territorios y la muerte.

3.2.2. Diagnóstico

El único método diagnóstico válido para cualquier tipo de tumor cerebral maligno es la obtención de material histológico. Ninguna otra tecnología diagnóstica fundamentada en aproximaciones más o menos sofisticadas o basadas en la enorme experiencia de profesionales es capaz de sustituir el valor único de la muestra de tejido tumoral. De forma general, jamás se debería comenzar un tratamiento de un tumor cerebral maligno sin disponer de esta información pues el riesgo de error sin muestra es totalmente inaceptable. Sin embargo, hay situaciones en las que el sentido común y, sobre todo, las decisiones terapéuticas apropiadas para cada escenario nos obligan a prescindir de la muestra de tejido. Por ejemplo, existen gliomas de tronco cuya resección quirúrgica no es viable técnicamente. Además, la biopsia en ciertos casos puede asociarse a efectos secundarios muy graves, incluidos la muerte del paciente. Está bien establecido que la biopsia, ocasionalmente, puede no proporcionar información histológica simplemente porque el territorio biopsiado no es homogéneo y la aguja puede haberse situado en la proximidad del tumor. En estos casos, hay oncólogos que deciden iniciar tratamiento asumiendo el riesgo inherente a este escenario. Esta situación sólo debería ser manejada por centros con muchísima experiencia en la gestión de estos casos. Lo ponemos a modo de ejemplo informativo para ilustrar la necesidad obligada de

disponer de información histológica pero también de la exigencia de abordar con sensatez cada situación clínica en función del mayor beneficio posible del paciente.

Las distintas tecnologías de imagen son críticas en el diagnóstico no histológico de un paciente con un tumor cerebral maligno. En este sentido, la tecnología más valiosa y sobre la que se fundamentan la mayoría de decisiones clínicas es la Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Esta tecnología es difícilmente sustituible por cualquier otro método. En RMN existen distintas modalidades de adquisición de imágenes. Entre todas ellas, la adquisición de imágenes mediante T1 nos proporciona una excelente resolución anatómica, donde el líquido cefalorraquídeo (LCR) emite señal negra y la administración de contraste permite la coloración en blanco de estructuras vasculares o vascularizadas de forma patológica. Teóricamente las conexiones neuronales también se deben visualizar en color blanco y realzar con el contraste mientras que los tumores y la sustancia gris se puede observar de color gris (**Figura 1**). En el sistema de adquisición de imágenes denominado T2, donde la T, dentro de la nomenclatura de la adquisición de imágenes por RMN, hace referencia al tiempo de relajación, siendo T1 el diferencial de relajación longitudinal del campo magnético y T2 el de relajación transversal, el LCR lo observaremos de color blanco de la misma manera que los tumores y el edema, aunque anatómicamente con peor resolución con el modelo de adquisición T1. Los sistemas de adquisición de imágenes mediante modificaciones FLAIR y STIR nos ayudan al diagnóstico diferencial de los sistemas T1 y T2.

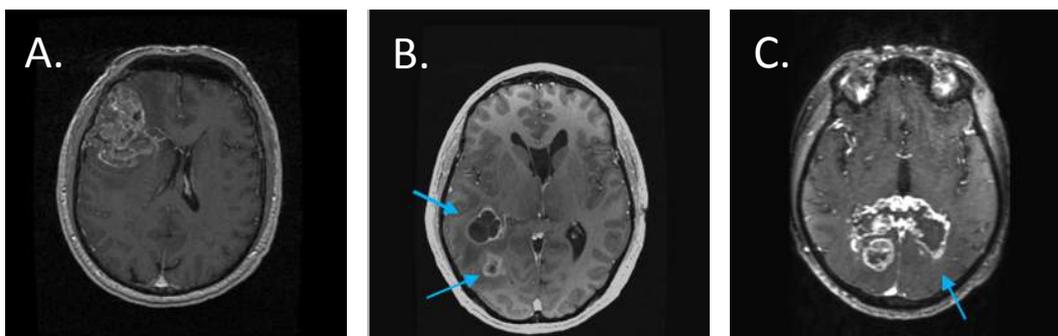


Figura 1. Ejemplo representativo de una imagen de RMN con Gadolinio como contraste, de diferentes patrones de crecimiento de GBM en cerebro humano. **A.** Patrón representativo de una sola masa abigarrada captante de contraste.

B. Patrón representativo de dos nódulos satélites (flechas azules). C. Patrón representativo de infiltración a través de haces de sustancia blanca del cuerpo calloso (flecha azul).

Existen otras metodologías diagnósticas con valor más reducido. Por ejemplo, la Tomografía Computerizada nos proporciona información anatómica de las estructuras óseas y, con frecuencia, es la primera técnica que se le realiza a un paciente con una sospecha de lesión cerebral del tipo que sea. Sin embargo, tiene un valor muy reducido para el seguimiento y/o tratamiento de nuestros pacientes. La SPECT así como su variante de fusión SPECT-TAC va adquiriendo poco a poco un valor que se perdió hace años. Sin embargo, en estos momentos la principal utilidad es intentar predecir el grado histológico del tumor cerebral en los instantes previos a la cirugía. Hay algunos médicos que en ausencia de otras tecnologías lo emplean para definir algunos tratamientos, pero estas decisiones no están fundamentadas en datos objetivos por lo que no puede considerarse ni estándar ni necesario para la adecuada gestión clínica de nuestros pacientes y, ni mucho menos, fundamento de ninguna decisión.

La PET-TAC ha aumentado en indicaciones en los últimos diez años a pesar de ser una tecnología con cerca de 40 años de historia. En tumores cerebrales su utilidad es reducida sobre todo si el radiotrazador empleado es glucosa, pues el cerebro sano consume exclusivamente glucosa. Sin embargo, algunos especialistas en medicina nuclear han conseguido adquirir suficiente experiencia como para proporcionar información muy relevante con esta técnica. Es evidente que la solución a esta limitación se fundamenta en la sustitución del radiotrazador evitando la glucosa e incorporando otros tales como la colina o la metionina. Estos radiotrazadores han tenido resultados diversos pero estamos muy lejos de su incorporación habitual y extendida en la práctica clínica.

En resumen, la única tecnología imprescindible en el diagnóstico y tratamiento correcto de los tumores cerebrales malignos humanos es la RMN.

3.2.3. Tratamiento

El tratamiento del GBM se fundamenta principalmente en la máxima cirugía neurológicamente posible, la radioterapia, el tratamiento médico con

quimioterapia y/o terapias biológicas y la terapia de soporte que debe conjugar el liderazgo académico del neurólogo con la verosimilitud de la recuperación funcional psíquica y física. Es decir, el tratamiento de este tipo de tumor obliga a la cooperación entre multitud de Especialistas Médicos e Investigadores con el doble objetivo central de aumentar la supervivencia y mejorar o mantener la calidad de vida.

CIRUGÍA

El objetivo principal de la cirugía es lograr la máxima resección manteniendo al mismo tiempo la mejor función neurológica que preserve la calidad de vida. Además, es crucial para obtener el diagnóstico histológico y permite una descompresión inmediata del cerebro ¹⁴. La radicalidad de la cirugía ha demostrado ser un factor pronóstico si la resección es superior al 98%. La posibilidad de resección depende de la “no localización del tumor en áreas elocuentes” o de la potencial morbilidad. Debido a ello, al 15-30% de los pacientes se les practica sólo una biopsia. Sin embargo, la resección quirúrgica, por sí misma, aumenta levemente la supervivencia por lo que se han realizado diferentes combinaciones terapéuticas para mejorar el control local y a distancia. Actualmente, la combinación de radioterapia y quimioterapia post- cirugía es la aproximación estándar aún cuando se han incorporado otras aproximaciones de control local con éxitos variados. Por ejemplo, el tratamiento local con nitrosoureas ha obtenido resultados interesantes. En este sentido, la inserción de obleas impregnadas con carmustina en el fondo de la cavidad quirúrgica tras obtener una resección macroscópicamente completa parece aumentar la supervivencia en un escenario con tratamiento radioterápico posterior pero sin quimioterapia ³⁶⁻³⁸. Sin embargo, la resección macroscópicamente completa es un factor de buen pronóstico en este tipo de pacientes por lo que se desconoce si el impacto sobre la supervivencia depende de los implantes de carmustina o del especial pronóstico de este subgrupo de pacientes. Lamentablemente, en el momento de redacción de este manuscrito, no existen estudios que comparen Gliadel® frente a temozolomida de forma aleatorizada en este subgrupo de pacientes aunque los datos iniciales que exploran la combinación de ambas aproximaciones son prometedores.

RADIOTERAPIA

El tratamiento con radioterapia tras la máxima cirugía posible es un estándar tras demostrar un aumento significativo en la supervivencia, que alcanzó los 8 meses de mediana en los primeros ensayos a finales de la década de los 70 y principios de los 80^{39,40}. Posteriormente, la evolución tecnológica ha mejorado la definición de dosis óptima (60Gy), así como los campos adecuados. Otras aproximaciones en este tipo de tratamiento tales como la intensificación de la dosis de irradiación, los radiosensibilizadores, la radiocirugía, el hiperfraccionamiento y otros tipos de abordajes en pacientes con un diagnóstico inicial de GBM no han demostrado mejorar los resultados en ensayos fase III bien diseñados.

Por tanto, la radioterapia (RT) post-operatoria (60 Gy en 30 fracciones durante 6 semanas) es el estándar en los gliomas de alto grado⁴¹. Esta opción de tratamiento ha demostrado beneficio incluso en pacientes ancianos con buen estado general⁴²⁻⁴⁴, por lo que su nivel de evidencia en términos de impacto en la supervivencia está fuera de toda duda. Finalmente, debemos destacar que la radioterapia puede jugar un papel con fines radicales en aquellos pacientes en los que no es posible una cirugía mínimamente cito-reductora por riesgo neurológico o quirúrgico.

QUIMIOTERAPIA

El fármaco más utilizado en primera línea del tratamiento del GBM es la temozolomida (TMZ). Este medicamento es un profármaco oral sintetizado como un derivado de segunda generación de la imidazoltetrazinona. A pH fisiológico se hidroliza a un mínimo de dos metabolitos activos que inducen eventos de alquilación y metilación sobre las posiciones N-7 y O-6 de las guaninas del ácido desoxyribonucleico (ADN) por lo que inducen muerte celular bajo ciertas condiciones bioquímicas.

En 2005 se publicaron los resultados positivos de la combinación de TMZ con la radioterapia tras la cirugía. Así, en el ensayo clínico fase III internacional pilotado por la European Organization for Research and Treatment of Cancer y el National Cancer Institute de Canadá (EORTC-NCIC), los pacientes fueron asignados aleatoriamente a recibir irradiación a dosis de 60 Gy durante 6 semanas (grupo control) o bien irradiación a las mismas dosis

y TMZ administrada diariamente a dosis de 75 mg/m² durante 6 semanas (o hasta un máximo de 7 semanas). Tras finalizar el tratamiento con RT y después de un descanso de 4 semanas de duración, los pacientes recibían hasta seis ciclos de TMZ programados los días 1 a 5 cada 28 días. La dosis fue de 150 mg/m² para el primer ciclo y se incrementó, siempre que la tolerancia lo permitió, a 200 mg/m² a partir del segundo ciclo ⁴⁵ (**Figura 2**).

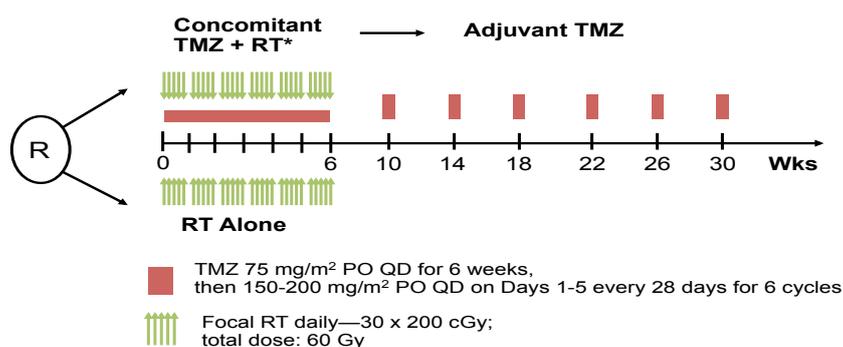


Figura 2. Diseño del estudio EORTC-NCIC.

En aquel estudio se incluyeron 573 pacientes obteniéndose una mediana de supervivencia global de 14,6 meses con el tratamiento combinado frente a 12,1 meses en el grupo control, con un HR ajustado por un modelo de riesgos proporcionales de Cox de 0,62 (95% CI 0,51–0,75, $p < 0.0001$). La mediana de supervivencia libre de progresión (SLP) fue de 6,9 y 5,0 meses, respectivamente, con un HR para muerte o progresión de 0,54 (95% CI 0,45–0,64, $p < 0.001$). La supervivencia a los dos años aumentó del 10,4% al 26,5% para el grupo tratado con TMZ. La actualización del seguimiento a 5 años del estudio EORTC-NCIC confirmó el beneficio en supervivencia global y libre de progresión para el grupo de pacientes tratados con TMZ, incluso al añadir la estratificación en función de los grupos pronósticos RPA III, IV y V. Todos estos beneficios se confirmaron en otro estudio fase II aleatorizado ⁴⁶. Así, estos resultados junto con el buen perfil de toxicidad de TMZ, asentaron el beneficio de la combinación de TMZ con radioterapia, seguido de al menos seis ciclos de TMZ como tratamiento estándar de la primera línea del GBM.

Recientemente, se ha introducido el uso de bevacizumab en combinación con radioterapia y temozolomida para pacientes diagnosticados de un GBM y sin tratamiento previo pues los datos procedentes de estudios en fase II fueron prometedores (**Tabla 5**).

Tabla 5. Datos procedentes de estudios en Fase III de bevacizumab en combinación con radioterapia y temozolomida.

	Lai et al 2011	Narayana et al 2012	Vrendenburgh et al 2010	Vrendenburgh et al 2011
N	70	51	125	75
Tratamiento experimental	RT+TMZ+Bev	RT+TMZ+Bev	RT+TMZ+Bev	RT+TMZ+Bev+CPT11
SG mediana	19.6	23	NR	21.2
SG 12 meses	NR	85.1	82	78.7
SG 16 meses	NR	NR	NR	65
SG 18 meses	54	NR	44	44
SG 24 meses	NR	42.5	44.9	NR
SLP mediana	13.6	13	13.8	14.2
SLP 6 meses	88	85.1	87.2	NR
SLP 12 meses	NR	51	64	62.7
SLP 24 meses	NR	NR	16	13.3

Por el momento, se han comunicado los resultados de dos grandes ensayos fase III denominados AVAGLIO y RTOG-0825 ^{47,48} 2014. Así, en el estudio AVAGLIO, los pacientes tratados con bevacizumab prolongaron significativamente su SLP en comparación con el brazo placebo ($p < 0,001$) siendo la mediana en el brazo de bevacizumab (Avastin[®]) de 10,6 meses frente a los 6,2 meses del brazo control, lo que supuso un aumento de 4,4 meses (71% de aumento). El riesgo de sufrir un evento (progresión o muerte) se redujo en un 36%, $HR=0,64$ (95% IC: 0,55-0,74) (**Figura 3**). Por otro lado, el estudio RTOG-0825, con un diseño virtualmente idéntico al ensayo AVAGLIO pero con variaciones en el reparto del error tipo I, los pacientes tratados con bevacizumab alcanzaron una mediana de SLP de 10,7 meses frente a los 7,3 meses del grupo control, con un HR para progresión de 0,79 (IC95% 0,66-0,94) y un valor de $p=0,007$. En ninguno de los dos estudios se demostró un incremento significativo en la supervivencia global, probablemente porque el propio diseño del estudio impedía identificar esa diferencia (entrecruzamiento de los brazos, selección de “mejores candidatos” para segunda línea, asimetría del error tipo I y otros). En cualquier caso, en la fecha de redacción de este manuscrito, las diferentes agencias reguladoras internacionales están

evaluando la incorporación definitiva de bevacizumab a la primera línea de tratamiento de esta patología.

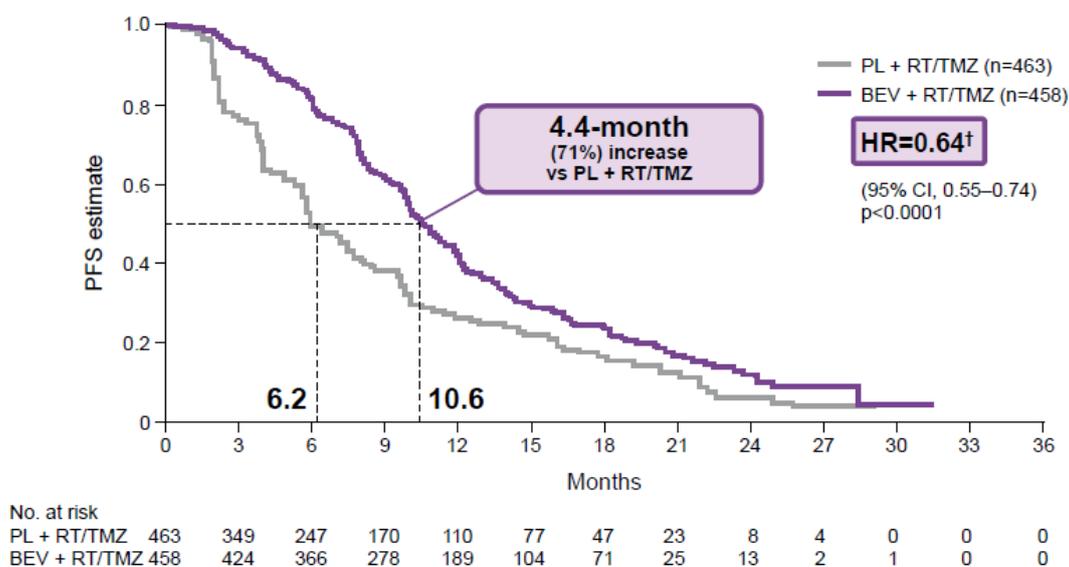


Figura 3. Representación gráfica mediante el método de Kaplan-Meier de la supervivencia libre de progresión obtenida dentro del ensayo AVAGLIO.

3.3. Biología molecular de gliomas malignos

En la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas más eficaces y eficientes frente a los tumores gliales malignos, es esencial extender nuestro conocimiento a las alteraciones genéticas y epigenéticas, que resultan en rutas moleculares aberrantes, responsables de la iniciación y progreso de los gliomas malignos. En este contexto, la clasificación, mencionada anteriormente, de los GBMs en dos grupos atendiendo al perfil clínico: GBMs primarios o *de novo*, y GBMs secundarios, es consistente con la aparición de diferentes alteraciones genéticas^{2,5}. Algunos genes como TP53, p16Ink4a, PTEN y EGFR, aparecen alterados con una frecuencia alta tanto en primarios como en secundarios. Sin embargo, estas alteraciones se piensa que aparecen en orden secuencial durante el proceso de malignificación de los gliomas (**Figura 4**). La pérdida o mutación de PTEN (gen supresor de tumores) junto con la amplificación y/o sobreexpresión de EGFR (oncogén), son alteraciones características de GBMs secundarios, mientras que mutaciones en TP53 (gen supresor de tumores) parecen ser eventos tempranos durante el desarrollo de GBMs secundarios. Además, es frecuente encontrar en los dos tipos

alteraciones en la señalización de factores de crecimiento y desregulación de puntos de control del ciclo celular.

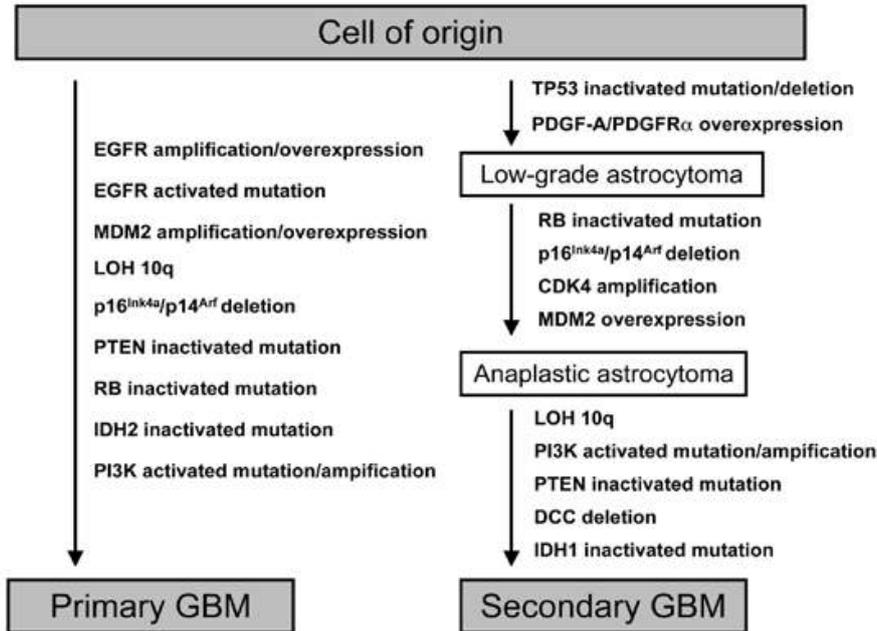


Figura 4. Alteraciones moleculares distintivas entre GBM primarios y secundarios. (Tomada de Marumoto *et al.*).

Se ha observado que los GBMs producen y secretan factores de crecimiento (PDGF, EGF, TGF, IGF, FGF, etc) y sobreexpresan sus correspondientes receptores (PDGFR, EGFR, FGFR2, etc). Este aumento en la señalización autocrina y paracrina mediada por dichos ligandos y receptores, activan rutas mitogénicas como MAPK, PI3K-AKT y PLC γ -PKC, las cuales tienen un impacto importante en gliomagénesis (**Figura 5**).

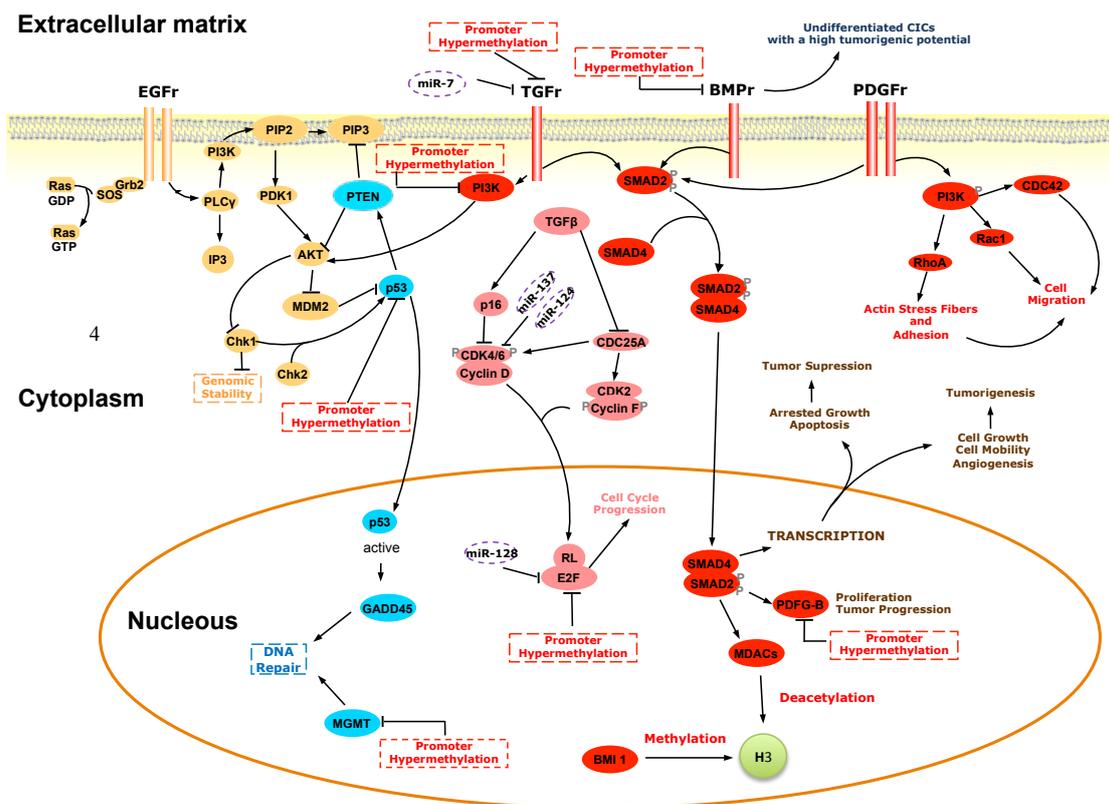


Figura 5. Representación esquemática de las principales interacciones genéticas y epigenéticas anormales en GBM. Los colores sólidos representan la ruta molecular principal en la que se han descrito interacciones genéticas y epigenéticas anormales en GBM. Las cajas en rojo claro, representan hipermetilación de la zona promotora de genes específicos relacionados con regulación del ciclo celular, reparación de ADN, apoptosis, angiogénesis, invasión, y resistencia a drogas. Las cajas en púrpura representan microARNs implicados en la regulación de genes específicos (adaptado de Pérez-García *et al.* ⁴⁹).

Así mismo, la desregulación del ciclo celular en GBMs es debido, en la mayoría de los casos, a alteraciones en *TP53* (tanto mutaciones como deleciones), principalmente en GBM secundarios. También se han observado mutaciones en el gen de *RB* en 10-25% de astrocitomas de alto grado, y silenciamiento del mismo, por amplificación de su antagonista *CDK4*, en el 15% de astrocitomas. Por último, el locus *CDKN2A*, que codifica para *p16^{INK4A}* y *P14^{ARF}* (que regulan positivamente las rutas de *RB* y *TP53* respectivamente), está delecionado en aproximadamente la mitad de los astrocitomas de alto grado. Además en oligodendroglioma anaplásico se encuentra frecuentemente los mismos efectos sobre *RB* y *TP53* (**Figura 5**).

Más recientemente, se ha identificado una mutación en el aminoácido 132 de la proteína IDH1 en más del 70% de astrocitomas de grado II y III, oligodendrogliomas y GBM secundarios. Además, los tumores con IDH1 intacta a menudo presenta una mutación en el aminoácido 172 de la proteína IDH2. Ambos aminoácidos se encuentran en el centro activo de la enzima. En estudios *in vitro*, se ha observado que la sobreexpresión de IDH1 mutada, se traduce en una reducción de alfa-cetoglutarato, lo que conduce a un incremento de HIF1 α , lo que promueve el crecimiento celular a bajas concentraciones de oxígeno. Así pues, parece que IDH1 promueve progresión tumoral en GBM. En el 80% de astrocitomas anaplásicos y GBM con mutaciones en IDH1 o IDH2, también aparece TP53 mutado, mientras que sólo el 3% presenta PTEN mutado, EGFR o *p16^{INK4A}*. Por el contrario, sólo en el 18% de astrocitomas anaplásicos y GBM con IDH1 e IDH2 intacto también aparece TP53 mutado, mientras que el 70% presenta PTEN mutado, EGFR o *p16^{INK4A}*. Estos datos sugieren que gliomas con mutaciones en IDH1 son genéticamente diferentes de aquellos que no presentan estos genes mutados

50

Varios de los factores de crecimiento mencionados anteriormente, junto con hormonas y citoquinas, regulan las rutas de transducción de señales. La mayoría de los receptores de estos factores de crecimiento están asociados con la actividad tirosina kinasa y, por tanto, con la activación de la ruta. La sobreexpresión o mutación de dichos receptores, o de efectores localizados aguas abajo, que se han identificado en gliomas malignos, son responsables de la activación constitutiva de dichas rutas de señalización, dando lugar a proliferación celular fuera de control, activación de mecanismos de supervivencia, invasión y secreción de factores angiogénicos. Así pues, con el objetivo de aumentar la especificidad y eficacia en los tratamientos, e intentar reducir los efectos secundarios, frente a gliomas malignos, se han descubierto y desarrollado un número importante de fármacos de nueva generación, tanto anticuerpos monoclonales, como inhibidores de bajo peso molecular, dirigidos a moléculas que forman parte de estas rutas de señalización.

Los anticuerpos monoclonales son proteínas multivalentes diseñadas para que sean altamente selectivas y afines a epítopos antigénicos, y que en el caso de los tumores cerebrales, se suele administrar de forma local para evitar

las dificultades a la hora de atravesar la barrera hematoencefálica, aunque algunos como los que neutralizan VEGF (por ejemplo bevacizumab), pueden actuar directamente en la zona luminal de los endotelios, sin necesidad de atravesar la barrera hematoencefálica (**Figura 6**).

Los inhibidores de bajo peso molecular con frecuencia son miméticos de Adenosina Trifosfato (ATP) que presentan afinidad con los sitios de unión de ATP de los dominios con actividad kinasa tanto en receptores de factores de crecimiento como en elementos de señalización intracelular. Sin embargo, los sitios de unión a ATP están muy conservados en los genes con actividad kinasa, y son por tanto, una diana de actuación de fármacos para la cual es difícil de conseguir alta selectividad. Así pues, la primera familia de fármacos que han alcanzado los ensayos clínicos presenta actividad en varias dianas, y se les ha denominado multiselectivos (por ejemplo sunitinib o sorafenib). El bajo peso molecular de estos inhibidores les concede, en principio, cierta ventaja para ser utilizados en el tratamiento de patologías en el sistema nervioso central, y muchos se están utilizando en estudios clínicos frente a gliomas malignos (**Figura 6**). Sin embargo, hay otros parámetros que pueden limitar su utilización en dichos tumores, algunos relacionados con la administración, como son las variables fisiológicas, la polaridad de los fármacos, o la presencia de transportadores activos en la barrera hematoencefálica, y otros más relacionados con mecanismos de resistencia en células tumorales. Así pues, se hace necesario desarrollar nuevas estrategias para la administración de dichos fármacos y modelos *in vitro* que mimeticen mejor los tumores primarios.

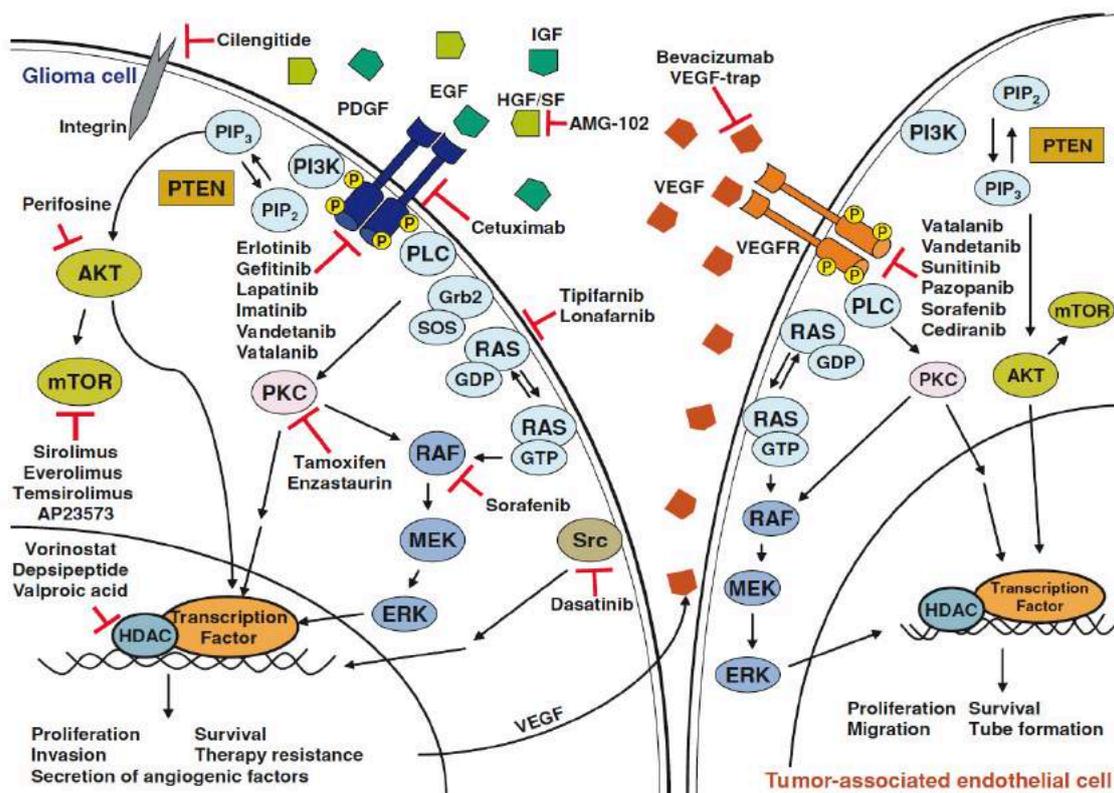


Figura 6. Mapa de rutas de transducción de señales y dianas de fármacos de última generación. Tanto las células de GBM como de las células endoteliales asociadas que con frecuencia presentan activación constitutiva de rutas de señalización de receptores de factores de crecimiento como EGFR, VEGFR o PDGFR entre otros. En condiciones normales, la unión del ligando al receptor induce la dimerización de dichos receptores y la fosforilación de residuos tirosina en el extremo carboxilo terminal. Esto lleva al reclutamiento de proteínas adaptadoras como Grb2 o SOS y la activación de rutas de transducción de señales intracelulares que regulan la transcripción de genes implicados en rutas oncogénicas. Algunas de estas moléculas son dianas de fármacos utilizados en ensayos clínicos frente a gliomas malignos. (Adaptado de Sathornsumetee *et al.*⁵¹).

3.4. Clasificación basada en técnicas ómicas

Debido a la baja incidencia de los gliomas malignos, tradicionalmente ha sido complicado trabajar con cohortes suficientemente grandes como para obtener información estadísticamente significativa que sirviera para estratificar gliomas de alto grado a nivel molecular. Por tanto, casi todas las clasificaciones estaban basadas en criterios histopatológicos. Sin embargo, en los últimos años, dos factores han contribuido a aumentar nuestro conocimiento sobre las alteraciones moleculares de gliomas de alto grado y a utilizar dicho

conocimiento para establecer clasificaciones basadas en alteraciones moleculares. El primero ha sido el desarrollo de técnicas ómicas, que permiten recoger conjuntos de datos completos relativos a la genómica, epigenómica, transcriptómica y proteómica, e integrarlos y analizarlos para descifrar el significado biológico del conjunto. El segundo factor han sido las iniciativas de grupos de investigadores que, trabajando en estructura de consorcio, han permitido el análisis de cantidades estadísticamente significativas de muestras biológicas en paralelo con los datos clínicos asociados a cada muestra ⁵². En este contexto, se han llevado a cabo estudios con diferentes tipos de arrays sobre cohortes significativas. En los primeros intentos por integrar datos procedentes de plataformas ómicas (microarrays de expresión de ácido ribonucleico (ARN)) con parámetros clínicos, se identificaron tres subtipos moleculares de gliomas malignos: proneural (PN), proliferativo (Prolif) y mesenquimal (Mes) (**Figura 7**). Dichos subtipos tenían además valor pronóstico, y presentaban una fuerte asociación con el grado del tumor a nivel histológico. Casi el 90% de los especímenes analizados procedentes de gliomas de grado III se clasificaban dentro del grupo de PN, al margen de que presentaran morfología oligodendroglial o astrocítica. Por el contrario, las lesiones de grado IV se dividían en PN (30%), Prolif (20%) y Mes (50%).

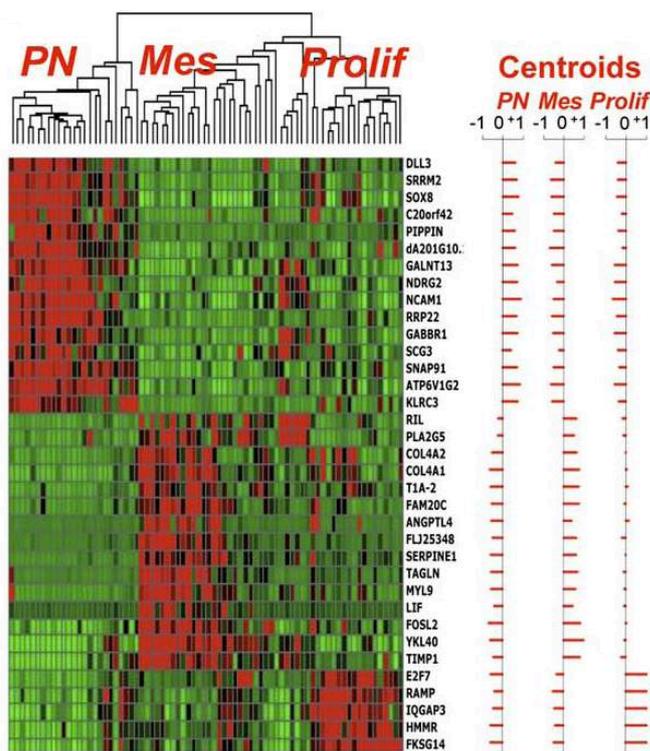


Figura 7. Diferentes subtipos de gliomas de alto grado basado en el perfil de expresión de ARN mensajero. (Adaptado de Philipps *et al.* ⁵³).

Además, se observó una tendencia en las recidivas al cambiar hacia el fenotipo mesenquimal. Las lesiones asociadas al subtipo PN presentan mejor pronóstico y expresan genes relacionados con cerebro normal y el proceso de neurogénesis. Por

el contrario, las lesiones asociadas a los subtipos Prolif y Mes presentan peor pronóstico y expresan genes relacionados con proliferación y angiogénesis respectivamente ⁵³⁻⁵⁵.

Ahora bien, la clasificación de gliomas malignos en función de alteraciones moleculares no es un proceso estático. Por el contrario, se trata de un proceso dinámico que se ve implementado a medida que mejoran las plataformas ómicas, la ampliación del espectro de moléculas analizadas o el aumento en el número de muestras estudiadas. En este sentido, una mejora significativa en las plataformas de análisis de expresión de ARN mensajero (ARNm) y de los algoritmos utilizados, permitió refinar la clasificación anterior, incluyendo 4 subtipos de gliomas de alto grado diferentes: proneural, neural, clásico y mesenquimal. Dichos grupos se correlacionan además, con la aparición preferente o coordinada de alteraciones moleculares concretas e incluso con el patrón de metilización en regiones promotoras en la secuencia de ADN ^{56,57}. Por otro lado, el enfoque global a la hora de estudiar la biología de los gliomas de alto grado ha permitido también estudiar aquellas alteraciones moleculares representativas separadas del resto de alteraciones puramente anecdóticas. Esta aproximación ha revelado alteraciones relevantes a nivel biológico en tres rutas clave: P53, RB y la señalización mediada por RTK/RAS/PI3K ⁵² (**Figura 8**).

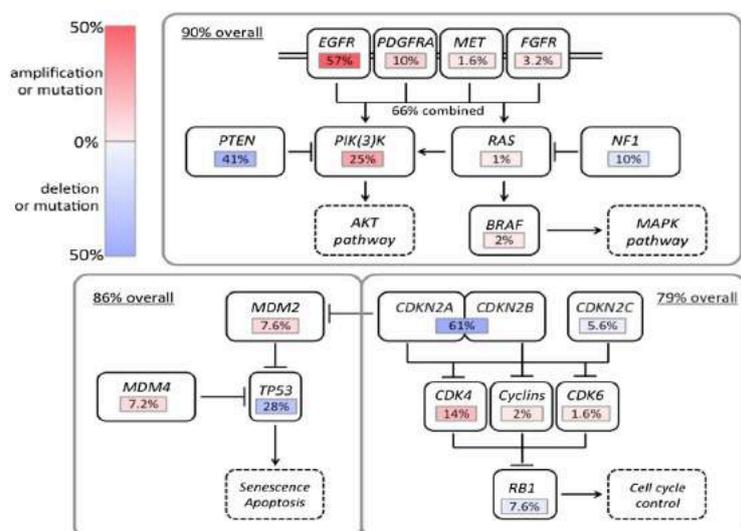


Figura 8. Alteraciones encontradas en las rutas canónicas de señalización de RTK/RAS/PI3K, P53 y RB (Adaptado de Brennan *et al.* ⁵⁸).

Continuando con el proceso dinámico de clasificación molecular de gliomas de alto grado. Recientemente, se han incorporado estudios de secuenciación masiva a los grupos de datos ya existentes, se han mejorado los algoritmos de análisis y se han llevado a cabo nuevos estudios de biología de sistema, en base a los cuales, se ha observado que en los diferentes subtipos moleculares de gliomas de alto grado aparecen combinaciones coordinadas de alteraciones moleculares que pueden tener repercusión clínica y diferente sensibilidad a la terapia ^{56,57}. Se han identificado genes mutados de forma significativa en GBM que ya se habían relacionado con dicho tumor como PTEN, TP53, EGFR, PIK3CA, PIK3R1, NF1, RB1, IDH1, y PDGFRA, pero además, también se identificaron genes que no se habían relacionado antes con GBM, como es LZTR1, localizado en el cromosoma 22q. Además se han purificado los datos relacionados con amplificaciones y deleciones de secuencias de ADN, permitiendo una identificación más precisa de genes diana candidatos a estar presentes en aberraciones somáticas que afectan al número de copias de ADN ⁵⁸ (**Figura 9**).

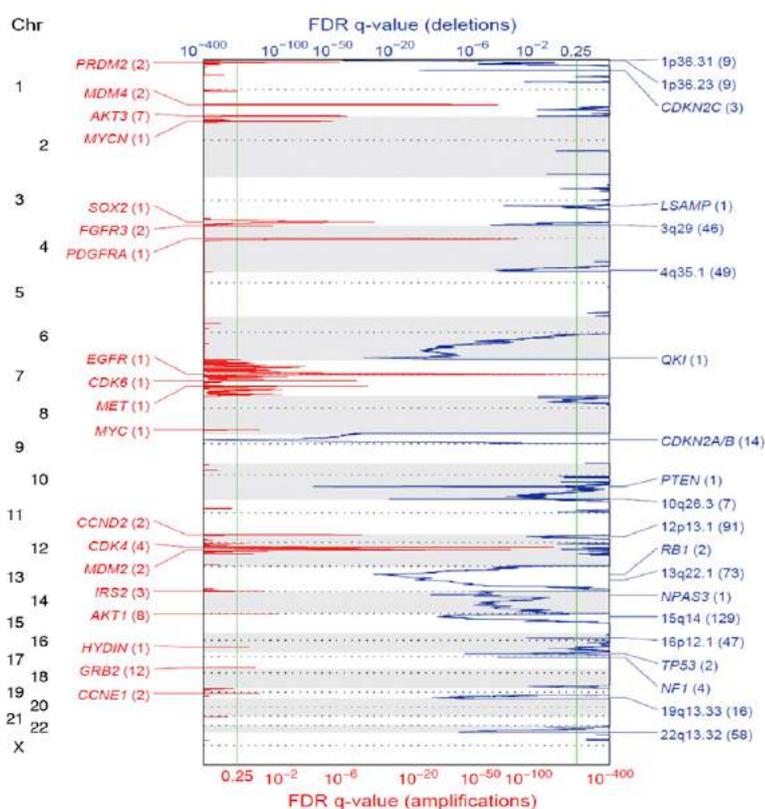


Figura 9. Sitios recurrentes donde aparecen alteraciones debidas al número de copias de ADN. Amplificaciones (rojo) y deleciones (azul) estadísticamente significativas. Se han anotado las regiones estadísticamente significativas (FDR

> 0.25) con el número de genes incluidos en paréntesis. Se han anotado los picos que contienen supuestos oncogenes o genes supresores de tumores.

Finalmente, en un intento por integrar toda la información acumulada hasta el momento, procedente de la aplicación de técnicas genómicas, epigenómicas, transcriptómicas, proteómicas y secuenciación masiva, y un número importante de muestras nuevas de una manera visual y sencilla, en la **Figura 10** se muestra un resumen representando de los diferentes subtipos, en paralelo con el grado del tumor y las alteraciones moleculares más frecuentes

49

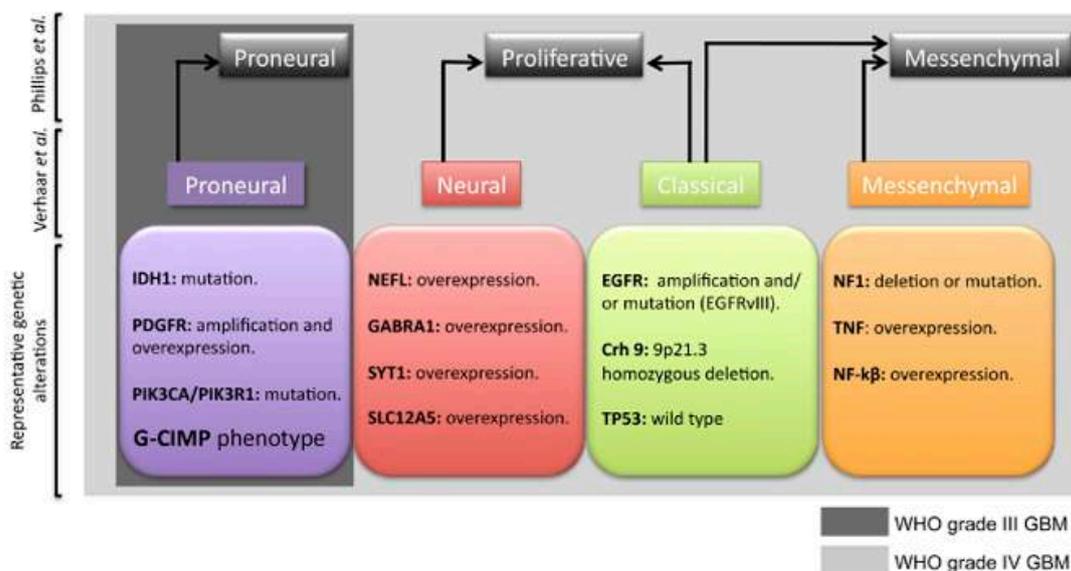


Figura 10. Representación de los diferentes subtipos moleculares de GBM incluidas la combinación de alteraciones moleculares más frecuentes en cada uno de ellos. (Adaptado de Pérez-García *et al.*⁴⁹).

3.4. Biología de células iniciadoras de gliomas malignos

El GBM, al igual que otros tipos de tumores que afectan a tejidos sólidos, se compone de poblaciones celulares heterogéneas. Dentro de la masa tumoral, una pequeña población denominada células madre tumorales o células iniciadoras de tumores (CITs) son responsables del inicio, mantenimiento del crecimiento neoplásico, perpetuidad y posible recurrencia^{59,60}. Estas células fueron identificadas inicialmente en leucemia, y más tarde en mieloma múltiple, y en tumores sólidos como cáncer de mama, y

meduloblastoma. La puesta a punto de métodos de cultivo para el aislamiento de células madre neurales adultas procedentes de cerebro humano permitió el aislamiento de dicha población de CITs procedentes de muestras quirúrgicas de GBM humano^{61,62}. Dicho aislamiento y caracterización se realizó inicialmente utilizando el marcador de superficie CD133^{61,63,64}. Sin embargo, algunos autores han aislado con éxito células proliferativas, con capacidad para ser expandidas *in vitro*, y características de células iniciadoras de gliomas de alto grado dentro del grupo CD133⁶⁵, y mediante la utilización de diferentes marcadores como LiCAM, SSEA-1, A2B5 o EGFR entre otros⁶⁶⁻⁷¹. Estos resultados indican que no hay un único marcador específico de células iniciadoras de gliomas de alto grado, y que es mucho más relevante el hecho de poder aislar cultivos primarios con características de células iniciadoras de tumores (**Figura 11**). En base a las publicaciones más recientes, la hipótesis más probable es que dichas células puedan desarrollarse a partir de células madre neuronales adultas (o embrionarias) o progenitores neuronales, en diferente grado de diferenciación, que se transforman tras la adquisición de mutaciones oncogénicas. En el cerebro adulto, las células madre neuronales y progenitores están localizadas en dos nichos separados, la zona subventricular de los ventrículos laterales y la zona subgranular del hipocampo^{72,73}. Además, se han aislado células progenitoras gliales en diferentes partes del parénquima cerebral^{73,74}. Todas estas células son potencialmente las células de origen de los tumores gliales (**Figura 12**). Las CITs, comparten características con células madre neuronales. Crecen en forma de esferas *in vitro*, presentan capacidad de proliferación y autorenovación, y expresan marcadores de indiferenciación, y marcadores de diferenciación de los tres linajes de células neuronales (astrocitocito, oligodendrocito y neurona) cuando se cultivan en condiciones de diferenciación⁷⁵⁻⁷⁷. Finalmente, cuando se trasplantan en cerebro de ratones inmunodeprimidos dan lugar a tumores cerebrales que reproducen la histopatología de los tumores de origen.

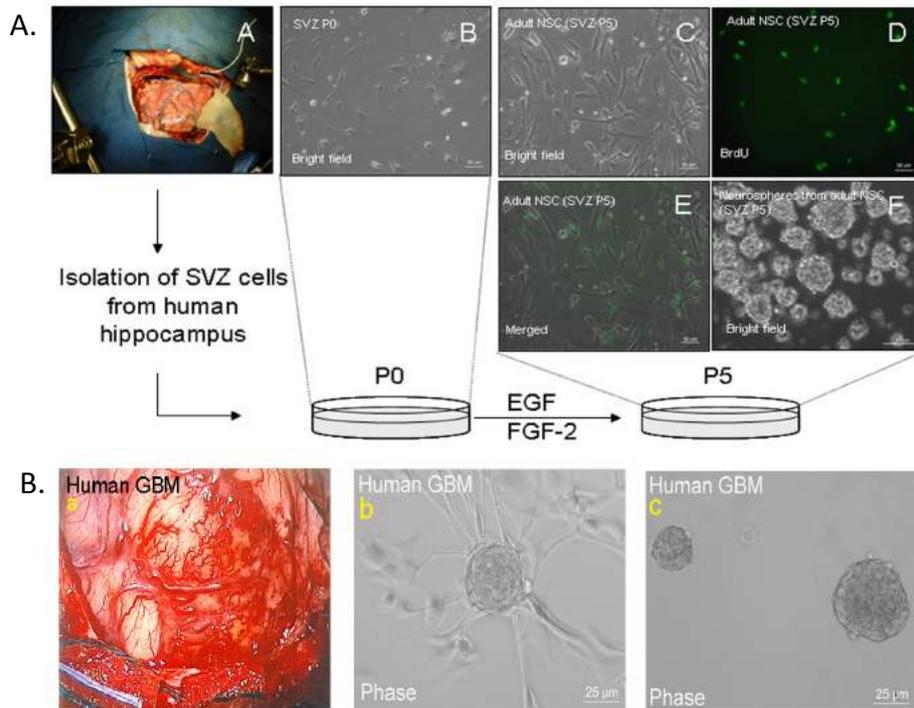


Figura 11. Proceso de aislamiento de células madre neuronal y/o progenitores gliales y células iniciadoras de tumores gliales a partir de muestras quirúrgicas de tejido cerebral humano adulto. **A.** Muestras procedentes de pacientes diagnosticados con epilepsia a los cuales se les practica una lobectomía temporal anterior como tratamiento (A). Las células aisladas a partir de dichas muestras son crecidas en medio sin suero con suplemento de EGF y FGF (B-F). En estas condiciones se obtienen cultivos de células con capacidad para proliferar (D-E) y que pueden crecer en forma de esferas en suspensión (F). Células en verde están marcadas con anticuerpo anti-BrdU. **B.** Muestras procedentes de pacientes diagnosticados con tumor glial de alto grado (a). Tras seguir el protocolo de aislamiento y expansión utilizado para células madre/progenitoras obtenemos cultivos de células iniciadoras de tumores gliales que crecen en forma de esfera unidas a la superficie del plato de cultivo (b), o en suspensión (c). (Adaptado de Greenfield *et al.*⁶² y Ayuso-Sacido *et al.*⁷⁸).

Una vez que se transforma la célula madre o progenitora original, la población homogénea de CITs y el nicho en el que se desarrollan sufrirán cambios a medida que el tumor se expande. Una vez formada esta primera población homogénea de CITs, comienza a formarse una red de vasos anormales, lo cual es una característica de gliomas de alto grado, con la

participación de una subpoblación de CITs ^{79,80}. La vasculatura normal y de nueva generación puede ser utilizada por algunas CITs para migrar hacia otras regiones del parénquima cerebral. A medida que los nichos cambian, las CITs también lo harán sufriendo cambios genéticos y epigenéticos en diferentes partes del tumor, mientras que el tumor se expande a lo largo del tiempo. Finalmente, dentro de un mismo glioma, podemos encontrar familias heterogéneas de CITs cuyos miembros proceden de un clon transformado original ⁸¹. Además, también se pueden encontrar familias heterogéneas de CITs entre diferentes tumores ⁸² (**Figura 13**). Estas células pueden ser aisladas y crecidas *in vitro*. Sin embargo, de acuerdo con la localización original del tejido biopsiado, y con la capacidad de proliferar *in vitro*, el tipo de célula de las líneas enriquecidas con células iniciadores de tumores gliales, puede ser muy diferente.

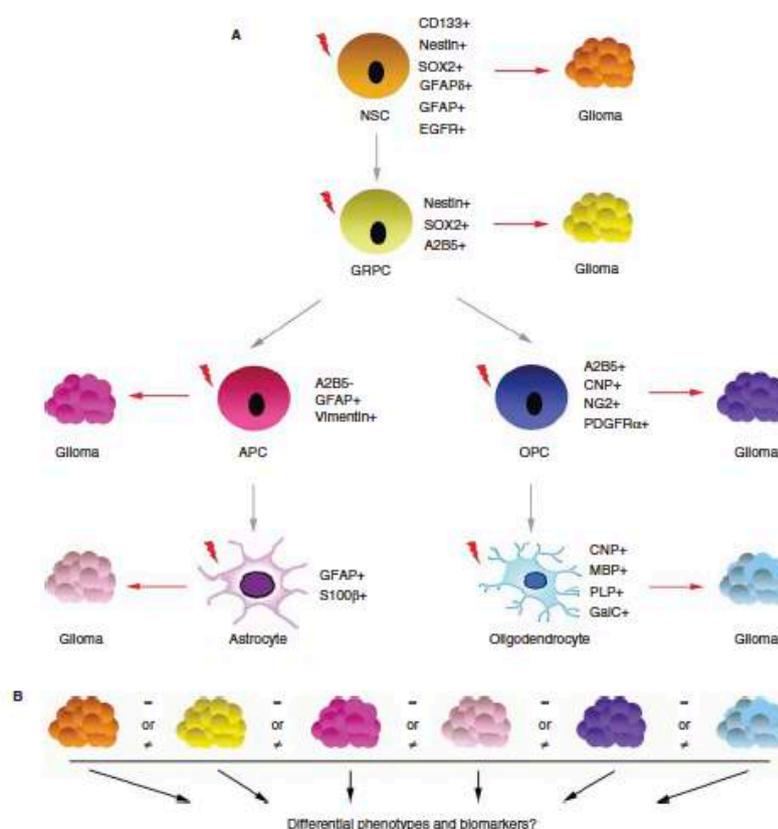


Figura 12. Representación de células en cerebro adulto con potencial para desarrollar tumores gliales. A. Representación esquemática simplificada de células gliales desarrolladas a partir de células madre neuronales con capacidad para diferenciarse en astrocitos y oligodendrocitos. Cada estadio se

identifica por la expresión de marcadores específicos. La flecha roja indica la posibilidad de adquisición de mutaciones oncogénicas. B. Papel de las células de origen en el inicio, progresión y recidiva del tumor, así como la respuesta al tratamiento. NSC, célula madre neuronal. GRPC, progenitor glial. APC, progenitor de astrocitos. OPC, progenitor de oligodendrocitos. (Adaptado de Jiang *et al.*⁸³).

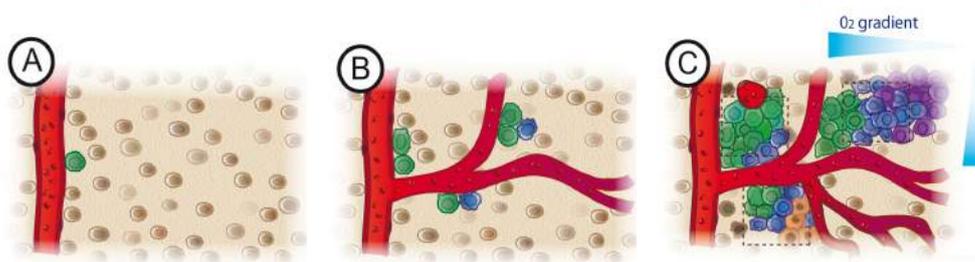


Figura 13. Modelo tentativo de la iniciación de tumores gliales. **A.** Primero tiene lugar la transformación de una célula madre glial o progenitora de astrocitos u oligodendrocitos cercana a algún vaso sanguíneo. **B.** Esta célula iniciadora del tumor presenta capacidad de autorenovación y permite la expansión clonal. Una subpoblación de células iniciadoras pueden además participar en procesos de angiogénesis. Los vasos sanguíneos podrían entonces ser utilizados por las células iniciadoras para migrar a otras regiones del parénquima cerebral. Debido a la inestabilidad genética, estas células podrían generar nuevos clones de células iniciadoras con nuevas alteraciones genéticas y epigenéticas, mientras se exponen a nichos diferentes. **C.** El conjunto total de clones puede evolucionar hacia un tumor primario formado por una población heterogénea, compuesta de diferentes tipos de células iniciadoras y diferentes nichos. De acuerdo con la localización de la biopsia, y con la capacidad de proliferar *in vitro*, el tipo de célula de las líneas enriquecidas con células iniciadoras de tumores gliales, puede ser muy diferente. (Adaptado de Romaguera-Ros *et al.*⁸⁴).

Continuando con la clasificación molecular de gliomas de alto grado propuesta en base a estudios sistemáticos con tecnologías ómicas, algunos autores han sugerido la posibilidad de que dicha clasificación sea reproducible en CITs aisladas a partir de muestras quirúrgicas de gliomas de alto grado. En este contexto, Günther *et al.*, llevaron a cabo un estudio comparativo de los perfiles de expresión de ARNm de 9 líneas de CITs, derivadas de GBM humano. De acuerdo a la clasificación realizada a partir de muestras de tejido, las 9 líneas se separaban en dos grupos que se caracterizaban por la

expresión diferencial de genes proneurales como DLL3 y mesenquimales como CD44. Ambos grupos, presentaban además diferencias biológicas en términos de crecimiento, diferenciación y capacidad tumorigénica cuando se trasplantaban en ratones nude ⁸⁵. En esta misma línea, Lottaz *et al.*, ha publicado un estudio en el que incluye 17 líneas de CITs derivadas de GBM humano, comparando sus perfiles de expresión de ARNm con el de células madre neuronales fetales y adultas. Encontraron que las diferentes líneas se separaban en dos grupos: el primero, con un perfil de expresión proneural (incluyendo la sobreexpresión de DLL3 y OLIG1) y más cercano al perfil de expresión de células madre neuronales fetales. Y el segundo, con un perfil de expresión claramente mesenquimal (incluyendo la sobreexpresión de CD44 y VEGF) y más cercano al perfil de expresión de células madre neuronales adultas ⁸⁶. Continuando con la clasificación de CITs, Mazzoleni *et al.*, clasificaron muestras de GBM humano y CITs en base a los niveles de expresión de EGFR. Encontraron que células EGFR⁺ procedentes directamente de muestras de tejido o de líneas de CITs son más tumorigénicas que las células EGFR⁻. Además, presentaban un perfil de expresión de ARNm más parecido a los subtipos proliferativo y mesenquimal ⁶⁹. Finalmente, en un trabajo más reciente, Wakimoto *et al.*, analizaron en detalle 15 líneas de CITs derivadas de GBM humano. Al igual que en los estudios anteriores, observaron que las líneas podían dividirse en dos grupos. El primero (11 de las 15 líneas), un alto grado de diseminación a través del parénquima cerebral cuando se trasplantaban en cerebro de ratón, mientras que el segundo (4 de 15 líneas), presentaba una distribución nodular. En ambos casos, reproducían la histopatología del tumor original. Sin embargo, no estudiaron la posible relación con los fenotipos proneural o mesenquimal ⁸⁷.

En resumen, parece demostrado que hay diferentes tipos celulares que potencialmente pueden ser responsables del inicio de los tumores gliales. Estas células pueden sufrir cambios genéticos y epigenéticos a lo largo del curso de la enfermedad, dando lugar a familias de CITs procedentes de un mismo clon, dentro de un mismo tumor. Además, la clasificación molecular, basada en información procedente de tecnologías ómicas, y datos clínicos, parece ser consistente entre tejidos de tumores gliales y CITs derivadas de dichos tejidos.

Las líneas establecidas, derivadas a partir de tumores gliales humanos y crecidas en medio con suero, han resultado muy útiles para aumentar nuestro conocimiento sobre la biología de dichos tumores, para identificar potenciales dianas terapéuticas y llevar a cabo programas de descubrimiento de fármacos dirigidos hacia estas dianas. Sin embargo, debido a los procesos de inestabilidad genética y a las condiciones de cultivo, estas células presentan nuevas alteraciones genéticas y epigenéticas que no aparecen habitualmente en tumores gliales de alto grado y representan poco los tumores primarios de los que se originaron, por lo que han dejado de ser un buen modelo *in vitro* de glioma humano. Por el contrario, los cultivos primarios CITs aisladas de muestras quirúrgicas de gliomas de alto grado humanos, crecidas en medio libre de suero, con la única presencia, como factores de crecimiento, de EGF y FGF2, constituyen el mejor modelo *in vitro* de dichos tumores en general, y podrían ser utilizados como avatares de los tumores primarios de los que proceden, a partir de los cuales obtener información que ayude a la clasificación de los tumores primarios, a la identificación de nuevas dianas terapéuticas y, lo que puede ser más relevante, a la elaboración de perfiles de respuesta a fármacos que ayuden en la toma de decisiones sobre el tratamiento más adecuado. En este sentido, es necesario llevar a cabo más estudios para entender mejor la biología de la CITs *in vivo*, así como averiguar el comportamiento de las mismas *in vitro*, incluyendo sus ventajas y limitaciones como modelo de glioma humano en diferentes diseños experimentales.

OBJETIVOS

Existen diferentes patrones de crecimiento de los GBMs que limitan la resección quirúrgica y la eficiencia del posterior tratamiento radioterápico y médico, impactando directamente sobre la supervivencia libre de progresión y global de los pacientes. Hasta la fecha, no ha sido posible identificar perfiles celulares que se vinculen a estos patrones de crecimiento. Así pues y considerando los antecedentes descritos en la introducción, en el presente trabajo se propone avanzar en el conocimiento de los modelos *in vitro* de gliomas de alto grado, basados en células iniciadoras de tumores derivadas de muestras quirúrgicas, como modelos generales de gliomas de alto grado, y como modelos particulares, representativos del tumor de origen y de su tipo de crecimiento.

Así pues, con objeto de desarrollar dicha propuesta, planteamos los siguientes objetivos:

1. Aislamiento, derivación, expansión y caracterización de cultivos primarios de células iniciadoras de gliomas de alto grado procedentes de muestras quirúrgicas de pacientes intervenidos por un GBM.
2. Descripción del grado de diseminación de CITs xeno-implantadas en cerebro de animales de experimentación: evaluación de posibles diferencias en el patrón de diseminación en relación con el número de pases en cultivo.
3. Estudio comparativo de la morfología celular de los diferentes cultivos primarios de CITs de gliomas de alto grado en relación con el número de pases en cultivo.
4. Evaluación de la expresión de genes relacionados con estados de diferenciación e indiferenciación en relación con el número de pases en cultivo.

5. Detección y análisis de alteraciones cromosómicas en relación con el número de pases en cultivo.

6. Análisis de la sensibilidad de CITs a fármacos de uso común en el tratamiento de diferentes tipos de tumores en relación con el número de pases en cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Justificación del número de cultivos primarios obtenidos

Gracias a las técnicas ómicas se ha podido elaborar una clasificación molecular de los tumores gliales malignos en 4 subtipos diferentes. Sin embargo, el estudio de los perfiles de expresión de ARNm de las líneas de CITs derivadas de muestras quirúrgicas de tumores gliales humanos, sólo se han podido asociar a dos de estos subtipos. Así pues, la clasificación de las CITs basada en criterios morfológicos es todavía extremadamente útil para clasificar la diversidad de dichos cultivos primarios. En este contexto, Günther *et al.*, describieron tres grupos principales de GBMs en función de la morfología de las esferas y el tipo de crecimiento de sus CITs en medio libre de suero. Así, para poder escoger un representante de cada uno de los tres grupos, necesitábamos derivar un número de cultivos primarios que aseguraran entre 3 y 4 líneas por cada grupo, lo cual suponía entre 9 y 12 líneas totales. Considerando que en nuestro laboratorio logramos derivar líneas de CITs en el 60% de las muestras recibidas, para el presente estudio consideramos que era necesario analizar un total de 20 muestras quirúrgicas procedentes de pacientes diagnosticados e intervenidos de un glioma de alto grado.

5.2. Selección de pacientes

Las muestras de tejido se obtuvieron de pacientes intervenidos en el Departamento de Neurocirugía del Hospital Universitario-Politécnico La Fé (Valencia, España). La autorización para el uso de aquel material se obtuvo tras la evaluación por parte del Comité Ético de Investigación del citado hospital y del Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia, además del consentimiento informado por parte de los pacientes candidatos.

En este sentido, los pacientes tenían que cumplir todos los criterios de inclusión descritos en el punto 5.2.1 y ninguno de los de exclusión listados en el punto 5.2.1.

El estudio obligaba a preparar la recogida de la muestra e iniciar el procedimiento de cultivo sin disponer de la confirmación histológica de la estirpe del tumor operado. Por ello, a los pacientes se les proponía un doble consentimiento en los cuales daba inicialmente su autorización a la recolección y procesamiento de una parte de la muestra quirúrgica que no interfiriera con el diagnóstico y, en el caso de que el patólogo local confirmara el diagnóstico de GBM, autorizaba el cultivo completo para la obtención de células iniciadoras de glioma. Para evitar el consumo indiscriminado de reactivos y optimizar las muestras se incorporó como criterio de inclusión que sólo se recogería muestra a aquellos pacientes en los que existiera una sospecha radiológica muy evidente de GBM. Con fines deontológicos, a ese criterio se añadió el requerimiento de que el neurocirujano responsable del paciente hubiera tomado la determinación de realizar una resección quirúrgica previamente a plantear la posibilidad de participar en este estudio.

5.2.1. Criterios de Inclusión

1. Sospecha radiológica de GBM susceptible de intervención quirúrgica con fines terapéuticos.
2. Confirmación histológica de glioma de alto grado por parte de un patólogo local.
3. Capacidad intelectual para proporcionar el consentimiento informado para la donación de tejido.
4. Capacidad neurológica para comprender el significado de la otorgación de consentimiento informado para la donación de tejido.
5. Edad mayor de 18 años.

5.2.1. Criterios de exclusión

1. Diagnóstico previo o concurrente de glioma de bajo grado, con o sin tratamiento.
2. Glioblastoma multiforme multifocal. Se entendió como multifocal a la presencia de lesiones satélites concurrentes sin conexión en una RMN cerebral

de 3T con una reconstrucción en 3 planos evaluada por al menos dos neuroradiólogos expertos.

3. Tratamiento previo con citotóxicos, independientemente del motivo.
4. Tratamiento previo con anti-comiciales, independientemente del motivo.
5. Tratamiento previo con anti-coagulantes, independientemente del motivo.
6. Tratamiento previo con anti-agregantes, independientemente del motivo.
7. Tratamiento previo con esteroides, excepto para el control del edema tumoral.
8. Tratamiento previo con radioterapia craneal, incluido cualquier tipo de radioterapia focal de alta dosis, independientemente del motivo.
9. Cualquier tipo de tumor maligno, independientemente del estadio y la histología, en los cinco años previos con un intervalo libre de enfermedad inferior a ese tiempo.
10. Cualquier tipo de infección activa en los 28 días previos a la resección quirúrgica.

5.3. Aislamiento, derivación y expansión de CITs

Durante el procedimiento quirúrgico establecido para el tratamiento del tumor, y una vez asegurada la cantidad necesaria de muestra para llevar a cabo los análisis histopatológicos necesarios para el diagnóstico, parte de la muestra del tumor sólido se introducía en un vial con suero salino. Dicho vial se transportaba inmediatamente a las instalaciones del Biobanco donde un investigador recogía la muestra y la procesaba en un plazo nunca superior a 12 horas desde la extracción de la misma.

La derivación de las CITs a partir de las muestras de tejido sólido se realizó siguiendo el protocolo descrito inicialmente en Roy NS *et al.*, 1999 y modificado posteriormente en nuestro laboratorio (Ayuso-Sacido *et al.*, 2007). Brevemente, las muestras se trocearon en pequeñas piezas, utilizando escalpelos del nº 15, y lavadas en HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} . A continuación se procedió a la digestión en PIPES con papaína (140 U/ml) y DNAsa (140u) durante 90 minutos a 37°C. Posteriormente se incluyeron en otra solución compuesta por una proporción 1:1 de la solución anteriormente indicada y de 80U de DNAsa diluída en DMEM-F12 y se

mantuvieron durante 30 min a 37°C. El tejido se trituró posteriormente con la ayuda de pipetas de vidrio de diámetro decreciente, y se filtró a través de un filtro con poros de 70 nm de diámetro. Se lavaron las muestras dos veces con DMEM-F12 y se sembraron en un frasco de cultivo en presencia de medio libre de suero que contenía: DMEM/F-12 (Gibco, 11039021) suplementado con aminoácidos no esenciales (10mM, Gibco, 11140), Hepes (1M; Gibco, 15630), D-Glucosa al 45% (Sigma, G7869), BSA-F5 al 7,5% (Gibco, 15260), Piruvato de sodio (100mM; Gibco, 11360), L-Glutamina (200mM; Gibco), antibióticos y antimicóticos (100x; Gibco, 15240), suplemento con N-2 (100x; Gibco, 17502), hirocortisona (1ug/ul; Sigma, H0135), tri-iodotironina (100ug/ml; Sigma, T5516), EGF (50ng/ul; Sigma, E9644), bFGF (25ng/ul; Sigma, F0291) y heparina (1ng/ul). Finalmente, las células fueron subcultivadas en periodos que oscilaban entre 20 y 30 días justo cuando las esferas alcanzaban un diámetro medio de 200 µm, momento en el cual empezaban a observarse células necróticas, de color pardo, en el interior de las mismas.

5.4. Análisis morfológico de esferas tumorales

Para llevar a cabo el análisis comparativo de morfología celular y arquitectura de las esferas, se tomaron dichas esferas tumorales cuando alcanzaron un diámetro aproximado de 100-150 µm y se fijaron con glutaraldehído al 3,5% (Electron Microscopy Science, Hatfield, USA) durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, las esferas se incluyeron en gotas de agarosa al 3% y se realizó una post-fijación con tetróxido de osmio al 1% (Sigma). Finalmente, se lavaron con agua, se deshidrataron mediante concentraciones crecientes de alcohol y se incluyeron en araldita (Durcupan, Sigma). El procesado y adquisición de imágenes fueron realizados en el servicio de microscopía electrónica de la Universidad de Valencia.

Para el análisis del tejido cerebral, los ratones se anestesiaron profundamente en un cámara de CO₂ y se realizó una perfusión intracardiaca de PBS al 0,9% que contenía heparina al 1%. Una vez garantizada la anticoagulación del animal, la solución de PBS se suplementó con paraformaldehído al 2% y glutaraldehído al 2,5% (PFA/GA, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) para obtener la mejor fijación tisular posible. Finalmente, una vez perfundido con la solución de fijación, se procedió a la

extracción del cerebro del ratón y se mantuvo toda la noche en la misma solución empleada para la perfusión. A la mañana siguiente se lavó con PBS frío (5 x 10 min) y se realizaron cortes de 50 μm en un vibratomo (Leica VT-1000), se lavaron con agua, se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol y se incluyeron en araldita (Durcupan, Sigma). El procesado y adquisición de imágenes fueron realizados en el servicio de microscopía electrónica de la Universidad de Valencia.

5.4.1. Estudio de cortes semifinos

Para ambos tipos de muestras, tanto neuroesferas tumorales como tejido cerebral, se obtuvieron secciones semifinas de 1,5 μm mediante una cuchilla de diamante que posteriormente se tiñeron con azul de toluidina al 1% (Panreac, Barcelona, España), y se analizaron utilizando un microscopio óptico de transmisión.

5.4.2. Estudio de cortes ultrafinos por TEM

Para el análisis de cortes ultrafinos, se partió de secciones semifinas de 1,5 μm , las cuales se embebieron en un bloque de araldita que separamos del porta mediante congelaciones y descongelaciones repetidas con nitrógeno líquido. Obtuvimos secciones ultrafinas (0,5 μm) del mismo bloque mediante una cuchilla de diamante, lo teñimos con citrato de plomo y se observó bajo microscopía electrónica de transmisión utilizando un Tecnai Spirit Electron Microscopy (FEI). Las fotomicrografías se obtuvieron con una cámara Morada (Soft Image System, Munster, Germany).

5.4.3. Estudio de la superficie mediante SEM

El procesado y adquisición de imágenes fueron realizados en el servicio de microscopía electrónica de la Universidad de Valencia.

5.5. Ensayos de diferenciación

Cultivamos las células durante 10 días en cámaras de 8 pocillos (Nalgene Nunc, 177402) recubiertas con Matrigel (Matrigel Basement Membrane Matrix (2mg/ml), BD, 356234) en medio libre de factores de

crecimiento suplementado con FBS al 10% para finalmente fijarlas en paraformaldehído al 4%.

5.6. Inmunocitoquímica e inmunohistoquímica

5.6.1. Inmunocitoquímica

Fijamos las células en paraformaldehído al 4% durante 20 minutos, posteriormente las lavamos con una solución de PBS durante 20 minutos a 37 °C y finalmente con una solución de PBS suplementada con Triton X-100 al 0,2% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente las células se incubaron con bromodesoxiuridina (BrdU) y se trataron con HCl 1N durante 30 minutos a 37°C que se neutralizó con un tampón de borato 0,1M pH 8,5 durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después se realizó un tratamiento frente a tinciones inespecíficas con una solución de suero de cabra 5%/Triton X-100 0,1%/PBS durante 15 minutos para finalmente realizar la incubación con los anticuerpos específicos durante toda la noche a 4°C.

Empleamos los siguientes anticuerpos:

- BrdU (especie: ratón; monoclonal, 1:100, Dako)
- GFAP (especie: conejo; policlonal, 1:1000; Dako)
- Tuj1 (especie: pollo, policlonal, 1:500, Sigma)
- CNPase (especie: ratón, monoclonal, 1:400, Sigma).

Una vez realizada la incubación con el anticuerpo primario se realizó una segunda incubación durante 90 minutos con el anticuerpo secundario conjugado con su color correspondiente de Alexa (1:500) y se contrastó empleando DAPI (1:1000) durante 15 minutos. Finalmente se montaron sobre cristales empleando Fluorsave Reagent (Calbiochem, 345789). Las imágenes fueron obtenidas mediante el microscopio confocal Leica TCS SP2 AOBS utilizando los objetivos adecuados. Las muestras se analizaron mediante la excitación correspondiente del fluoróforo: 405nm (DAPI), 488nm (Alexa Fluor 488, Dylight 488) y 561nm (Alexa Fluor 555, Texas Red) ó 647nm (Alexa Fluor 647).

5.6.2. Inmunohistoquímica

Para llevar a cabo la tinción con *anti-human nuclei* (especie: ratón, monoclonal, 1:100, Abcam), los cortes de 50 µm se lavaron en PBS 0'1M, y se procedió a la recuperación del antígeno mediante tampón citrato sódico 10mM,

a 60°C en pH 6.0 , y se dejó incubar durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se volvieron a lavar con PBS 0'1M y se bloquearon las peroxidasas endógenas con una solución de H₂O₂ al 3% en methanol 10% y PBS, durante 15 minutos en ambiente oscuro. Después, se realizaron nuevos lavados con PBS 0'1M- Tritón X-100 0'2% (PTA) y se procedió al bloqueo de tinciones inespecíficas con NGS 5% durante 30 min. A continuación, se añadió el anticuerpo primario anti-human nuclei (1:100) y se incubó durante toda la noche a 4°C. A continuación, lavamos con PTA e incubamos con el anticuerpo secundario (cabra anti-ratón biotinilado (1:200)) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, lavamos de nuevo con PTA y añadimos ABC durante 1 hora. Volvimos a lavar con PTA y revelamos con DAB. Por último, montamos las muestras sobre cristales supergelatinizados y se observaron al microscopio óptico.

5.7. RT-PCR y QRT-PCR

Se extrajo ARN total utilizando Rneasy Mini o Micro kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sintetizó ADN cíclico (ADNc) partiendo de 1 microgramo de ARN. Amplificamos las muestras con cebadores específicos y con la Paq5000 polymerase (Stratagene) en un termociclador Mastercycler (Eppendorf). La qRT- PCR se realizó empleando un LightCycler 480 (Roche). Para cada experimento realizamos dos controles negativos, eliminando la transcriptasa inversa de la mezcla para la reacción de ADNc así como la muestra de ADN de la mezcla para la PCR.

5.8. Diseño de cebadores y validación

Se diseñaron cebadores específicos para marcadores de indiferenciación y diferenciación de linaje astrocitario, neuronal y oligodendrogial. Para ello, obtuvimos las secuencias de la base de datos de la Universidad de California, Santa Cruz (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgNear>). Se escogió la zona 3'UTR para el diseño de los cebadores, dada su alta variabilidad entre genes. Las secuencias fueron introducidas en el programa Primer3 (disponible en <http://frodo.wi.mit.edu/>), y se diseñaron parejas de cebadores que amplificaran zonas de 100-200 pares de bases, con el menor riesgo de formación de homodímeros y heterodímeros. Posteriormente se

procedió al análisis mediante BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para comprobar *in silico* la especificidad de los mismos. Por último, para su validación experimental se utilizaron muestras biológicas descritas como controles positivos en diferentes fuentes bibliográficas. La lista completa de cebadores puede consultarse en la **tabla 7**

Tabla 7. Cebadores empleados para el estudio por PCR

Símbolo del gen	Nombre del gen	Cebadores	Tamaño amplicón (Pb)	control positivo
B2M	Beta-2-microglobulina	CTCGCGCTACTCTCTTTCTG	335	U87
		GCTTACATGTCTCGATCCCACT		
CD90	Thymocyte differentiation antigen 1	CGCTCTCCTGCTGCTAACAGTCTT	120	U87
		CAGGCTGAACTCGTACTGGA		
BM1	B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog	GGAGACCAGCAAGTATTGTCCCCTTTTG	320	U87
		CATTGCTGCTGGGCATCCGTAAG		
CD133	Prominin 1	TCTCTATGTGGTACAGCCG	350	U87
		TGATCCGGGTCTTACCTG		
GFAP δ	Glial fibrillary acidic protein isoform delta	AGTGGTAAAGGTGGTGAAGTCTT	126	human GBM
		GTCCAGGCACAGCGAGAC		
MELK	<i>Maternal embryonic leucine zipper kinase</i>	CTTGGATCAGAGGCAGATGTTGGAG	248	human GBM
		GTTGTAATCTTGCATGATCCAGG		
NES	Nestina	GAGAGGGAGGACAAAGTCCC	251	U87
		TCCCTCAGAGACTAGCGCAT		
SOX2	Sex determining region Y-box 2	GCACATGAACGGCTGGAGCAACG	206	human GBM
		TGCTGCGAGTAGGACATGCTGTAGG		
CD44	CD44	AGAAGGTGTGGGCAGAAGAA	116	U87
		AAATGCACCATTTCCTGAGA		
GFAP α	Glial fibrillary acidic protein isoform alpha	TGCGGTCCCTTCTACTCAC	232	U373
		CCTCCCAGTCCCATCTCTG		
S100B	S100 calcium binding protein B	TGCGAGTTCTGATGGAGTTG	160	U373
		TGCGAGTTCTGATGGAGTTG		
TUBB3	Beta- III tubulina	GAGGAAGAGGGCGAGATGTA	166	U87
		GAGGGGAAAGCAGGGTGT		
MAP2	Microtubule-associated protein 2	ATTCGAGGTTCCAACACAC	102	U87
		ACCAGCCATTGAAGAAATGC		
PDGFR α	Platelet-derived growth factor receptor subunit a	ATAATCCCCACAGGCACATT	118	human oligodendro glioma tissue
		TCACACATTACCACACACATT		
CNP	2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase	CAGGACCGCCAAAGAATG	172	U87
		GGAAAGGAGGGGAGTGAGAC		
Mush-1	Mushashi	GATGGTCACTCGGACGAAGAA	149	U87
		CAAACCCTCTGTGCCTGTTG		
Oct 3/4	POU transcription factor	CAAAAACCCTGGCACAACCT	128	U87
		CCTGTCTCCGTCAACACTCT		

5.9. Xeno-implantes

Todos los experimentos con animales fueron aprobados y ejecutados de acuerdo con las guías del Comité Institucional de Cuidado Animal del Centro de Investigación Príncipe Felipe así como de acuerdo con las directrices y normativas nacionales y de aplicación en la Unión Europea.

Inoculamos una media de 75,000 células mediante un sistema estereotáctico en el núcleo estriado del hemisferio derecho cerebral (0 mm anterior y 2,5 mm lateral al bregma, 3,5 mm intraparenquimatoso de ratones desnudos de 9 semanas de vida (Charles Rives Laboratories). Los ratones fueron sacrificados cuando comenzaron a presentar síntomas neurológicos y/o una pérdida significativa de peso, lo que habitualmente sucedía en los siguientes 3 meses.

5.10. Hibridación genómica comparativa (CGH)

El ADN genómico aislado de CITs se cuantificó por espectrofotometría (NanoDrop ND1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware USA). La integridad del ADN se evaluó por electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%. Se marcó el ADN sin amplificar (método directo) siguiendo la v4.0 del protocolo denominado *Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis* (Agilent Technologies, Palo Alto, California USA. p/n G4410-90010). Así, 500 ng de ADN genómico de la muestra problema y la misma cantidad procedente de ADN genómico de un *pool* femenino que actuó como referencia, se fragmentaron en un paso inicial de digestión por enzimas de restricción. Esta digestión se confirmó mediante un ensayo ADN 7500 Bioanalyzer. Posteriormente utilizamos cianina-3-dUTP y cianina-5-dUTP para el marcado fluorescente del ADN genómico procedente de la muestra problema y de la referencia respectivamente mediante el *Agilent Genomic DNA Labeling Kit PLUS* (Agilent p/n 5188-5309) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN marcado se hibridó con el *Human Genome CGH Microarray 44K* (Agilent p/n G4426B-014950) que contiene más de 43000 secuencias humanas, tanto codificantes como no codificantes. Los arrays se leyeron en un *Agilent Microarray Scanner* (Agilent G2565BA) de acuerdo con el protocolo del fabricante y se extrajeron los datos utilizando el *Agilent Feature Extraction Software 9.5.3.1* siguiendo el protocolo de Agilent denominado CGH-

v4_95_Feb07 (*Lowess Only* como método de corrección por normalización en vez del denominado *Linear Only*) así como el “QC Metric Set CGH_QCMT_Feb08”. En el análisis de los datos se utilizó *DNA Analytics 4.0* de Agilent. Las regiones de aberración estadísticamente significativas se determinaron por medio del algoritmo ADM-2 con un umbral de 6.0 con un mínimo de tres sondas alteradas. Los resultados se corrigieron manualmente para eliminar falsos positivos detectados e incluir falsos negativos no detectados por el algoritmo.

5.11. Ensayos de viabilidad mediante MTT

Para evaluar la sensibilidad a fármacos de los tres cultivos primarios de CITs en pases tempranos y pases tardíos, realizamos primero una selección de fármacos utilizados en el tratamiento de gliomas de alto grado o en diferentes fases de desarrollo clínico. Para evaluar el número de células totales después del tratamiento utilizamos MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide). Dicho compuesto es reducido por células metabólicamente activas mediante la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa generando un compuesto de color azul (formazán), que puede ser solubilizado y medido por espectrofotometría. Así pues, primero disociamos las esferas en células individuales y, a continuación, sembramos 1500 células por pocillo en placas de cultivo que contenían 96 pocillos. Posteriormente, dejamos las células 3 días en el interior del incubador. Pasados los tres días, añadimos diferentes concentraciones de los diferentes fármacos de interés (siempre en monoterapia) y volvimos a depositar las células en el interior del incubador. Después de 3 días contamos las células viables utilizando MTT (Promega) siguiendo las recomendaciones del fabricante, y cuantificamos la densidad óptica a una longitud de onda de 540 nm utilizando un espectrofotómetro Epoch (Bio Tek). Todos los ensayos fueron repetidos por cuadruplicado en dos experimentos diferentes.

5.12. Procedimientos estadísticos

El análisis estadístico descriptivo e inferencial se realizó empleando el software SPSS v19.0. Para realizar comparaciones de proporciones utilizamos el método Chi cuadrado realizando los ajustes según la corrección de Fischer

cuando fue necesario. Para realizar comparaciones entre niveles de expresión mediante RT-PCR o QRT-PCR utilizamos la prueba t de Student.

RESULTADOS

6.1. Aislamiento, derivación y expansión de CITs de muestras quirúrgicas de pacientes con gliomas de alto grado.

Hemos utilizado un total de 20 muestras de tejido tumoral humano procedentes de pacientes diagnosticados con glioma de alto grado. De estos 20 especímenes analizados, 11 mostraron un crecimiento sostenido por encima de 10 pases en cultivo. El resto de especímenes mostraron una tasa de proliferación baja y entraron en senescencia entre los pases 3 y 5 (**Tabla 1**). Consistente con los diferentes tipos de crecimientos publicados por Günther *et al.*, observamos que los 11 cultivos primarios derivados con éxito, mostraban diferentes características en cuanto al crecimiento, pero podían ser agrupadas en tres subgrupos. Un subgrupo, formado por 3 cultivos primarios, crecía como esferas unidas a la superficie, las cuales se despegaban y continuaban creciendo en suspensión; el segundo subgrupo, formado por 5 cultivos primarios, crecían en suspensión desde el comienzo y, el último subgrupo, formado por 3 cultivos primarios, crecía como combinación de células en monocapa y esferas unidas a la superficie, las cuales se despegaban cuando alcanzaban tamaños grandes entorno a 200 μm . Con objeto de llevar a cabo el presente trabajo, seleccionamos un representante de cada subgrupo; esto es: el GBM18 del primer subgrupo, el GBM27 del segundo y el GBM38 del tercero (**Figura 1A**).

Tabla 1. Muestras quirúrgicas utilizadas en el presente trabajo

Nº de muestra	Edad	Sexo	Diagnóstico	Cultivo Primario	Subgrupo
13	59		GBM	No	
7	65		GBM	No	
14	71		GBM	Si	1
35	63		GBM	Si	3
15	61		AA	Si	2
16	65		GBM	No	
18	59		GBM	Si	1
32	45		GBM	No	
22	45		GBM	Si	2
29	56		GBM	Si	2
27	61		GBM	Si	2
37	56		GBM	No	
35	58		GBM	No	
5	61		AA	No	
33	50		ODG	Si	3
43	56		GBM	Si	1
51	63		GBM	No	
53	39		AA	Si	2
56	57		AA	No	
38	63		GBM	Si	3

Clave: GBM: Glioblastoma Multiforme; AA: Astrocitoma Anaplásico; ODG: Oligodendroglioma. Subgrupos de clasificación de acuerdo al tipo de crecimiento *in vitro*.

Una vez seleccionados los cultivos primarios de CITs con los cuales realizar el presente trabajo, se llevaron a cabo una selección de experimentos encaminados a verificar que dichas células cumplieran los criterios necesarios para ser consideradas CITs. Así pues, con objeto de descartar la posibilidad de que estas células fueran en realidad células madre neuronales adultas, realizamos un ensayo de hibridación genómica comparativa (CGH), utilizando DNA genómico extraído de cada uno de los tres cultivos primarios en pase 1. En los tres casos observamos la pérdida de heterogeneidad (LOH) en el cromosoma 10 y la duplicación del cromosoma 7, entre otras alteraciones cromosómicas. Estas alteraciones constituyen una de las características fundamentales del GBM (**Figura 1B**). A continuación, las células se crecieron bajo condiciones que promueven la diferenciación espontánea a células que

expresan marcadores de astrocito, neurona y oligodendrocito. Encontramos células que expresaban al mismo tiempo marcadores de diferentes linajes neurales. Este es un hecho diferencial con respecto a células madre neuronales adultas, y una característica de células iniciadoras de tumores gliales de alto grado (**Figura 1C**). Seguidamente estudiamos la expresión de marcadores de indiferenciación y de diferenciación. Se observó que GBM18 y GBM27 expresaban CD133, SSEA1, CD44 y CD90, todos ellos referidos en la literatura como marcadores que identifican subpoblaciones de CITs, además de marcadores de indiferenciación específicos de células madre neuronales adultas. Es llamativa la ausencia de CD133 y SSEA1 y los bajos niveles de expresión de Nestin en GBM38. Sin embargo, cuando analizamos en detalle los perfiles de CGH de GBM38 observamos una pérdida de heterogeneidad en 4p15.32 y 11q21, las localizaciones cromosómicas de CD133 y SSEA1 respectivamente. Finalmente, observamos unos niveles de expresión de MAP-2 y β III-Tub similar en los tres cultivos primarios, mientras que la expresión del marcador de astrocitos GFAP se encontró sólo en GBM18 y GBM27 y niveles más elevados de los de oligodendrocitos CNPase y PDGFRa en GBM18 y GBM38 (**Figura 1D**).

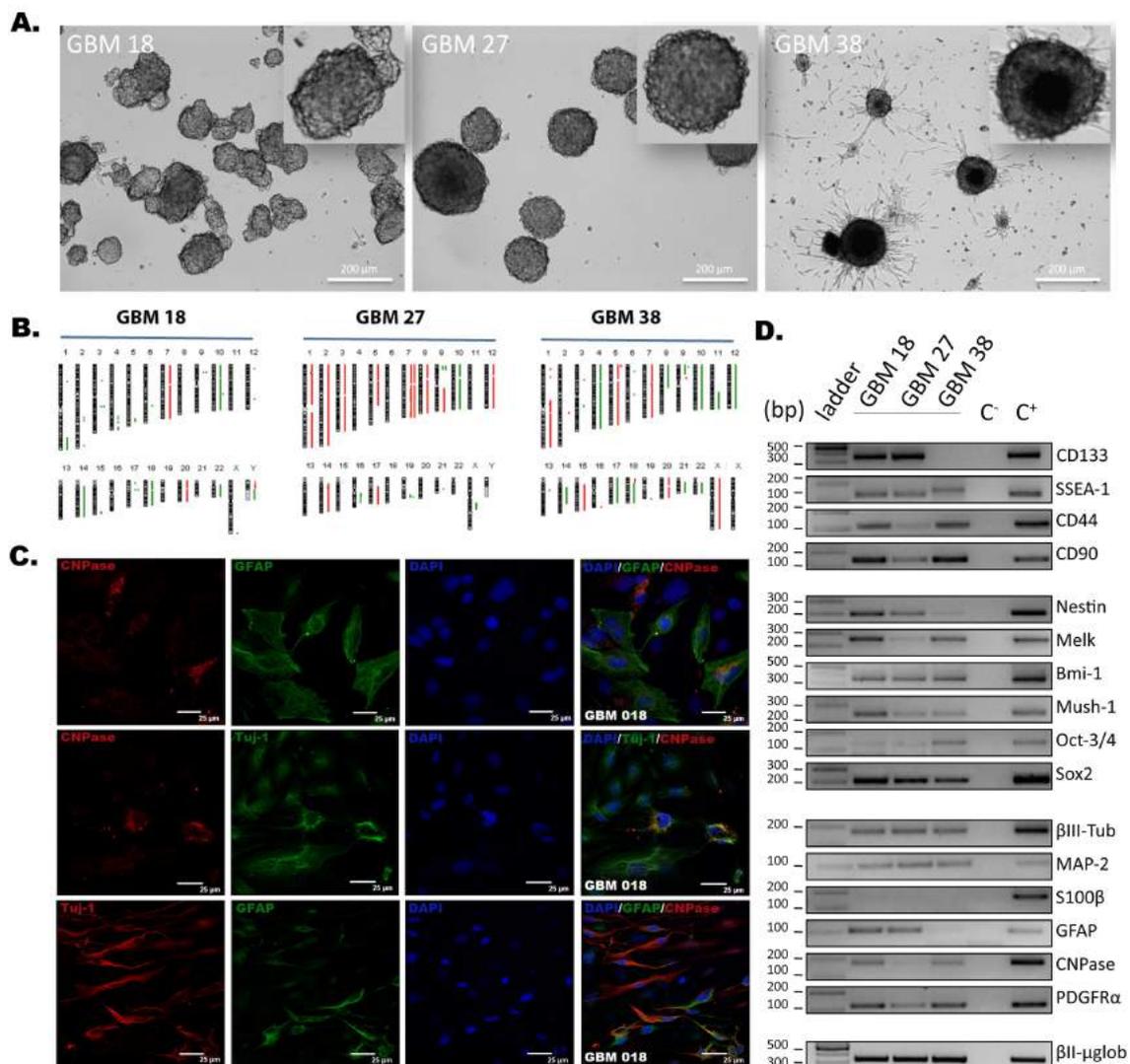


Figura 1. Aislamiento, derivación y caracterización de CITs a partir de las muestras GBM27, GBM18 y GBM38. **A.** Imagen al microscopio óptico de CITs mostrando los tres tipos representativos de crecimiento *in vitro* de esferas. **B.** El cariotipo obtenido mediante CGH muestra anomalías cromosómicas compatibles con GBM. **C.** Cuando se induce diferenciación espontánea en presencia de suero y por un período de 10 días, aparecen células que expresan GFAP (astrocitos), Tuj1 (neuronas) y CNPasa (oligodendrocitos) (imágenes representativas del GBM18). **D.** Perfil de expresión de genes de indiferenciación y diferenciación en CITs correspondientes a las muestras GBM18, GBM27 y GBM38.

A continuación, con objeto de estudiar la capacidad de los tres cultivos primarios de CITs seleccionados para reproducir las características de los tumores de origen, se llevaron a cabo xeno-implantes en el cuerpo estriado de cerebros de ratones inmunodeprimidos Nude. Pasados 12 semanas desde el implante de CITs, los animales fueron sacrificados y se analizó la presencia y

distribución de las células implantadas mediante tinción con el anticuerpo anti *human-nuclei* que reconoce específicamente un antígeno asociado a núcleos de células humanas. Observamos la presencia de células implantadas en todos los casos analizados. Los tumores de procedencia de los cultivos GBM18 (**Figura 2A**) y GBM27 (**Figura 2G**), habían sido descritos a nivel clínico como altamente diseminados, mientras que aquél que dio lugar a GBM38 se describió como un tumor nodular (**Figura 2M**). Consistente con este hecho, observamos que las células de GBM18 y GBM27 aparecieron diseminadas por el parénquima cerebral del hemisferio ipsilateral, e incluso alcanzaba el hemisferio contralateral. Estas células utilizaban principalmente los haces de mielina en el cuerpo calloso y la comisura inferior para desplazarse y, en el caso de GBM18, se observó también su asociación con el endotelio de vasos sanguíneos (**Figura 2B-F, H-L**). Sin embargo las células de GBM38, aparecían formando estructuras nodulares en el hemisferio ipsilateral (**Figura 2N-P**).

6.2. Análisis morfológico de cultivos primarios

Con objeto de poder estudiar la presencia de diferencias morfológicas en las células de diferentes cultivos primarios de gliomas de alto grado, así como posibles cambios morfológicos en las esferas tumorales, o en las células de las esferas, en relación a los pases en cultivo, se tomo un número representativo de esferas de cada uno de los tres cultivos (10 esferas de cada cultivo con un diámetro medio de 150 μm), se incluyeron en araldita, se realizaron cortes semifinos para su observación al MO y, posteriormente cortes ultrafinos para su observación al TEM. Finalmente, 5 esferas de cada cultivo, se procesaron para ser observadas al SEM.

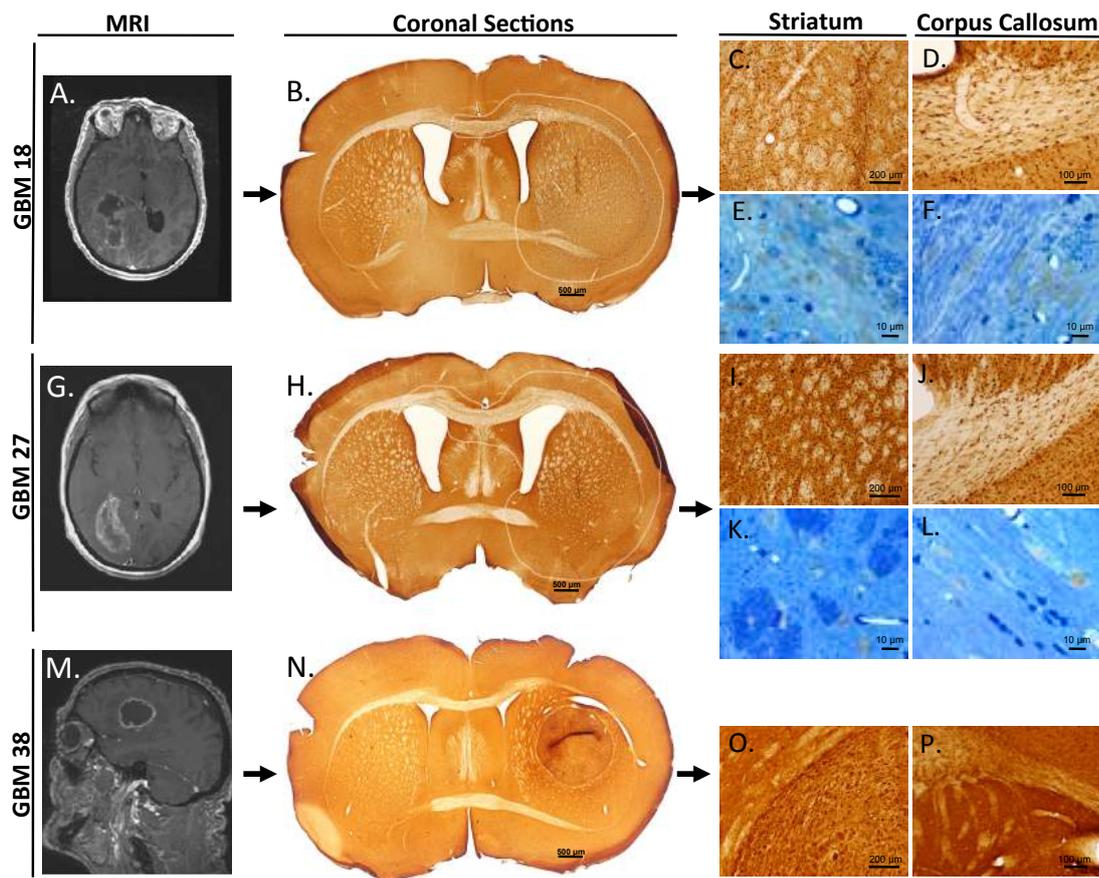


Figura 2. Xenoinplantos de células de GBM18, GBM27 y GBM38 en cerebro de ratones inmunodeprimidos Nude. Para cada cultivo primario se muestra la primera imagen por RMN realizada al paciente de origen. Las células tumorales de origen humano fueron identificadas mediante inmunohistoquímica con un anticuerpo anti *human-nuclei* y revelado con DAB (color marrón oscuro). **A.** RMN al diagnóstico del paciente origen del cultivo primario GBM18. **B.** Corte coronal del cerebro de ratón, en blanco se muestra el perímetro que marca el patrón de migración de la CITs en dicho plano. **C-D.** Imagen aumentada al MO de un corte de 50 μm en la zona del cuerpo estriado y cuerpo calloso. **E-F.** Imagen aumentada al MO de un corte semifino teñido con *human-nuclei* en marrón y azul de toluidina. **G.** RMN al diagnóstico del paciente origen del cultivo primario GBM27. **H.** Corte coronal del cerebro de ratón, en blanco se muestra el perímetro que marca el patrón de migración de la CITs en dicho plano. **I-J.** Imagen aumentada al MO de un corte de 50 μm en la zona del cuerpo estriado y cuerpo calloso. **K-L.** Imagen aumentada al MO de un corte semifino teñido con *human-nuclei* en marrón y azul de toluidina. **M.** RMN al diagnóstico del paciente origen del cultivo primario GBM38. **N.** Corte coronal del cerebro de ratón donde se observa el patrón nodular de las CITs. **O-P.** Imagen aumentada al MO de un corte de 50 μm en la zona del cuerpo estriado y cuerpo calloso.

6.2.1. Caracterización morfológica I: cortes semifinos (OM)

Para estudiar la estructura tridimensional de cada uno de los tres tipos de esferas, llevamos a cabo cortes seriados de 1,5 μm y analizamos la morfología de las células y la disposición de las mismas dentro de la esfera. En todas las esferas encontramos células con núcleos polimórficos, algunos multilobulados, aunque no observamos células plurinucleadas (**Figura 3B₁-C₄**). Observamos la presencia de células en división, en diferentes puntos de la esfera, desde el interior hasta la periferia, aunque la mayoría se encontraban en posiciones periféricas. No se aprecian muchos espacios intercelulares en GBM18 y GBM27, aunque si en GBM38 y se observa presencia de matriz extracelular en todos los casos (**Figura 4E₁-F₄**). Los tipos celulares promedios de cada cultivo eran significativamente diferentes entre ellos, con inclusiones que diferían en tipo y número. Sin embargo, dentro de cada cultivo primario, las células presentaban un alto grado de homología.

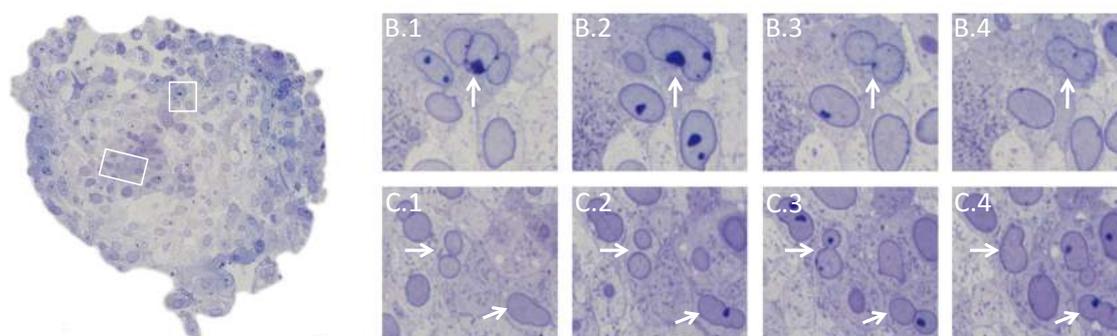


Figura 3. Cortes seriados semifinos, teñidos con azul de toluidina, correspondientes a una esfera tumoral tipo de GBM18. Los recuadros en blanco marcan la zona seleccionada para mostrar a mayores aumentos. B.1-B.4. La flecha blanca muestra un mismo núcleo polilobulado. C.1-C.4. Las flechas muestran dos núcleos polilobulados (Barra de escala 10 μm).

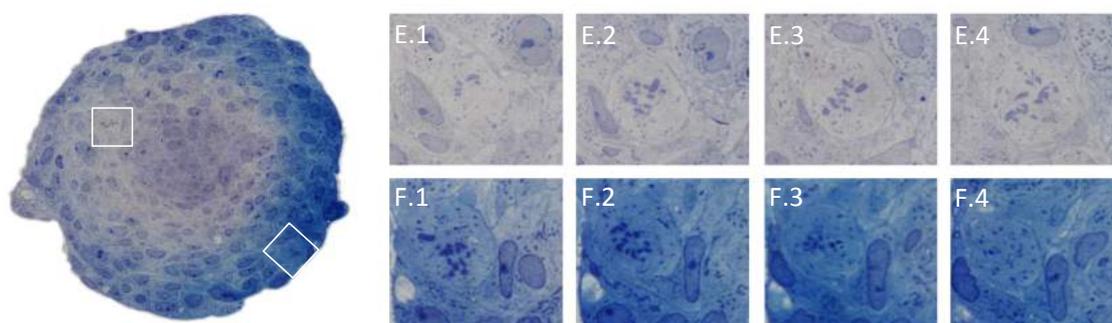


Figura 4. Cortes seriados semifinos, teñidos con azul de toluidina, correspondientes a una esfera tumoral tipo de GBM27. Los recuadros en blanco marcan la zona seleccionada para mostrar a mayores aumentos. E.1-E.4. y F.1-F.4 muestran dos células en división situadas en la periferia de la esfera (Barra de escala 10 μm).

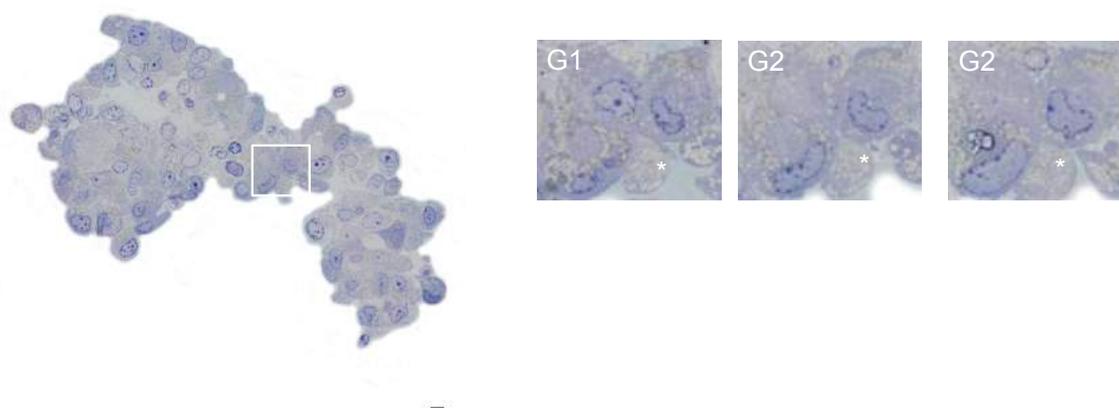


Figura 5. Cortes seriados semifinos, teñidos con azul de toluidina, correspondientes a una esfera tumoral tipo de GBM38. El recuadro en blanco marca la zona seleccionada para mostrar a mayores aumentos. *, señala el contenido en inclusiones diferentes en cantidad y tipo de las observadas en GBM18 y GBM27 (Barra de escala 10 μm).

6.2.2. Caracterización morfológica II: cortes ultrafinos (TEM)

A continuación analizamos series de cortes ultrafinos en el microscopio electrónico de transmisión, con objeto de poder observar estructuras intracelulares con más detalle. De forma general observamos que dentro de cada esfera, el grado de homología entre diferentes células era muy alto. Sin embargo, encontramos desde células con pocas inclusiones hasta células con un gran número de inclusiones, posiblemente más diferenciadas. Cada cultivo primario de CITs, presentaban inclusiones mayoritarias de diferente tipo y morfología, pero muy homogéneas dentro de cada cultivo. En el caso de GBM18 la mayoría de los núcleos son ovalados, algunos multilobulados, muestran típicamente un o dos nucleolos evidentes y cromatina laxa. La ratio núcleo / citoplasma aparece aproximadamente constante dentro de la esfera. El citoplasma aparece típicamente claro, excepcionalmente oscuro, con acúmulos consistentes con depósitos de polisacáridos, no rodeado de membrana, presentando un mayor acúmulo hacia el interior de la esfera, o en cualquier caso, en microambientes de la esfera más alejados de la superficie y

más compactos, con pocos espacios intercelulares, pero con restos de matriz extracelular (**Figura 6A-C**). En el resto de orgánulos intracelulares no se aprecian alteraciones (**Figura 6D**). Las células de las esferas de GBM27 presentan núcleos multilobulados, pero con cromatina laxa, y nucleolos evidentes. El núcleo ocupa aproximadamente el 50% de la célula. Aparecen típicas inclusiones lipídicas, esféricas y electrodensas (**Figura 6E-F**). Al igual que en el caso de GBM18, dentro de la esfera, las células no presentan complejos de unión, el espacio extracelular es escaso pero se observa matriz extracelular (**Figura 6G**). El retículo endoplasmático y el aparato de Golgi y las mitocondrias no presentan alteraciones destacables (**Figura 6H**). Finalmente, las células de las esferas de GBM38 presentan núcleos irregulares, solo una pequeña proporción bilobulados o multilobulados. La ratio núcleo / citoplasma es en general homogénea. A diferencia de GBM18 y GBM27, aparece un gran número de inclusiones lipídicas, que en algunas células llega a ocupar el 90% del espacio intracelular. Este hecho se verificó mediante tinción con *oil red* (**Figura 7**). Aparecen además acúmulos de polisacáridos e inclusiones electrodensas. Orgánulos intracelulares sin alteraciones aparentes y mitocondrias con crestas desorganizadas (**Figura 6L**). Hay más espacios extracelulares que en el caso de GBM18 y GBM27 pero en la mayoría de los casos está relleno de matriz extracelular (**Figura 6K**).

6.2.3. Caracterización morfológica III: esferas (SEM)

Finalmente, analizamos la superficie de las esferas de cada cultivo primario utilizando microscopía electrónica de barrido. Observamos un perfil diferente de proyecciones celulares y microvellosidades en los tres tipos de cultivos primarios estudiados. Es representativo el hecho de que las proyecciones celulares son mucho más homogéneas en las esferas de GBM18 que en las de GBM27 y mucho más heterogéneas en forma y tamaño en GBM38 (**Figura 8**).

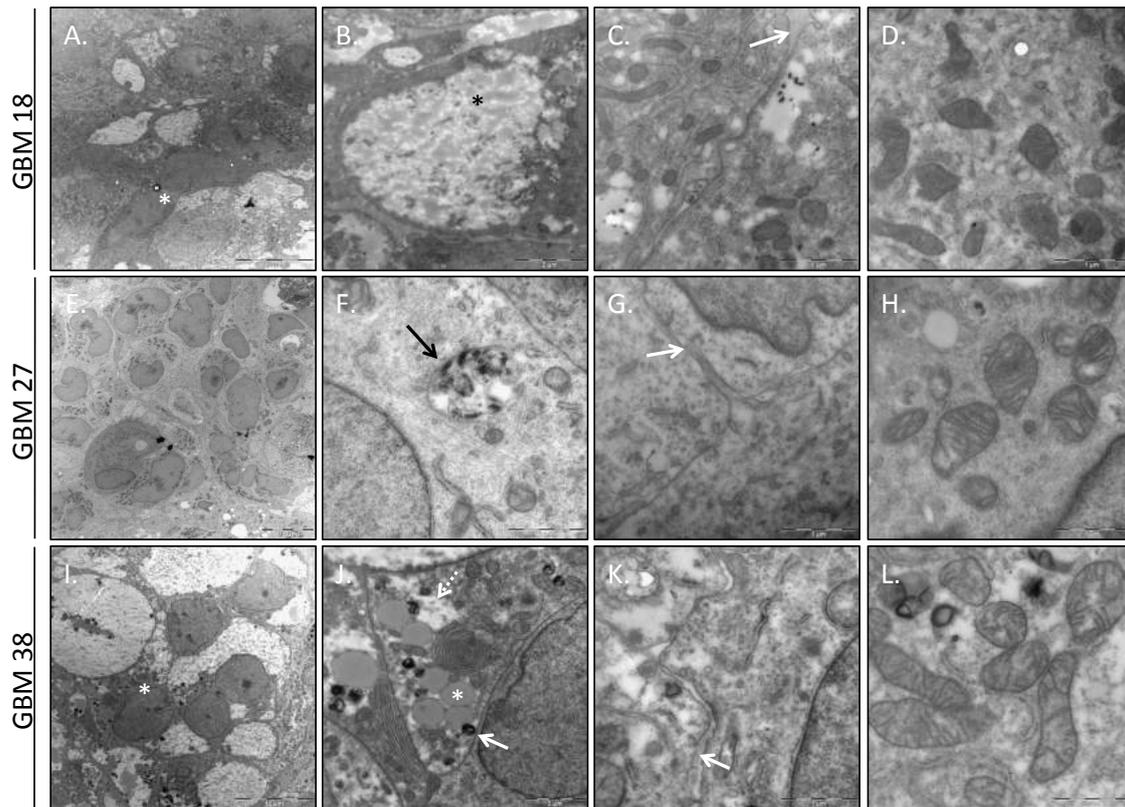


Figura 6. Análisis comparativo de la morfología de células procedentes de GBM18, GBM27 y GBM38 analizadas mediante microscopía electrónica de transmisión. **A-D.** Organización celular y extracelular en esferas pertenecientes a GBM18. **A***, indica una célula con pocos o sin acúmulos o inclusiones citoplasmáticas. Flecha blanca, indica la presencia de matriz extracelular. **E-H.** Organización celular y extracelular en esferas pertenecientes a GBM27. **G**, flecha negra, indica la presencia de inclusiones electrodensas rodeadas de membrana. Flecha blanca, indica la ausencia de complejos de unión y presencia de matriz extracelular. **I-L.** Organización celular y extracelular en esferas pertenecientes a GBM38. **I***, indica una célula con pocos o sin acúmulos o inclusiones citoplasmática. **J**, flecha blanca punteada indica acúmulos de polisacáridos, flecha blanca indica inclusiones electrodensas. **K**, flecha blanca indica la ausencia de complejos de unión y presencia de matriz extracelular (barra de escala A, E, I 10 μ m, resto 1 μ m).

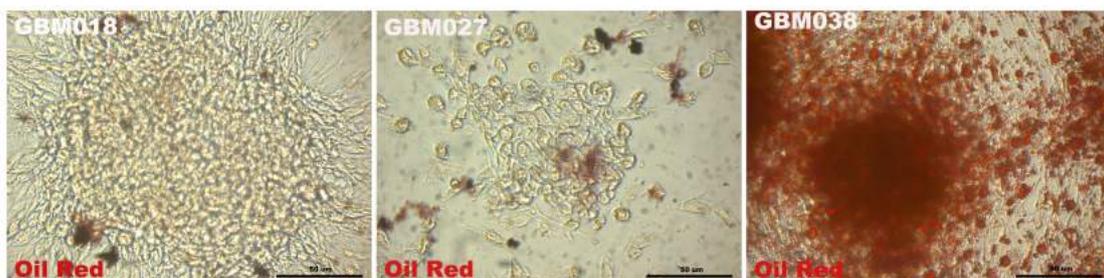


Figura 7. Tinción *Oil-Red* sobre esferas de GBM18, GBM27 y GBM38 para revelar la presencia de inclusiones lipídicas (rojo). Estas inclusiones se

observan ligeramente en GBM27 y de forma evidente en GBM38 (barra de escala 50 μm).

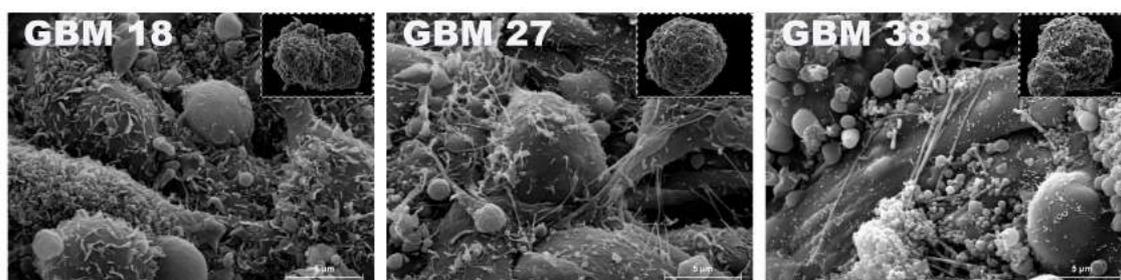


Figura 8. Fotomicrografía de barrido de la superficie de esferas tumorales de GBM18, GBM27 y GBM38. En los vértices superiores derechos se muestra la morfología de la esfera (barra de escala 40 μm). En el resto de la imagen se muestra una ampliación de una región representativa de la esfera (barra de escala 5 μm).

6.3. Expansión de CITs y toma de muestras para la realización de análisis comparativo en relación al número de pases en cultivo.

Una vez seleccionados los cultivos primarios representantes de los tres tipos de crecimiento *in vitro*, y verificado que todos cumplieran los requerimientos para ser considerados cultivos de células enriquecidas en células iniciadoras de gliomas de alto grado. Procedimos a la expansión de los cultivos hasta completar los 20 pases. Durante el proceso de expansión nos enfrentamos con dos problemas que limitaban el tipo de experimento que podíamos realizar a la hora de caracterizar los potenciales cambios de los tres tipos de cultivo a lo largo de los pases. Uno de ellos es el bajo número de células, sobre todo en pases iniciales, y el segundo la baja proliferación, que extendía los tiempos entre dos pases a una ventana entre 20 y 30 días. Esto tiene dos consecuencias inmediatas. La primera es que debemos seleccionar un número limitado de experimentos que, sin embargo, nos aporten mucha información, y segundo, que completar los 20 primeros pases en cultivo conlleva aproximadamente 2 años de trabajo. Así pues, considerando nuestra experiencia previa, decidimos estudiar posibles cambios en el patrón de proliferación así como analizar las posibles alteraciones morfológicas durante la adaptación de los cultivos primarios al crecimiento *in vitro*, los cambios de expresión en genes relevantes para mantener el estado indiferenciado característicos de CITs, los posibles eventos de alteraciones cromosómicas

fruto de la propia inestabilidad cromosómica de células tumorales y de la posible influencia del medio de cultivo y, por último dos ensayos funcionales como son: las posibles alteraciones en el patrón de diseminación *in vivo* y los cambios en la sensibilidad a fármacos utilizados en el tratamiento estándar de tumores gliales de alto grado o que se estén utilizando en ensayos clínicos frente a dicha patología. Finalmente, con objeto de facilitar el análisis comparativo, realizamos dos colecciones de datos. La primera comprendía todos los datos obtenidos con los pases del 1 al 10, a los cuales llamamos pases tempranos. Y la segunda, con los datos procedentes de los pases del 11 al 20, los cuales llamamos pases tardíos. Con todas estas ideas en mente, planteamos el flujo de trabajo descrito en la **figura 9**.

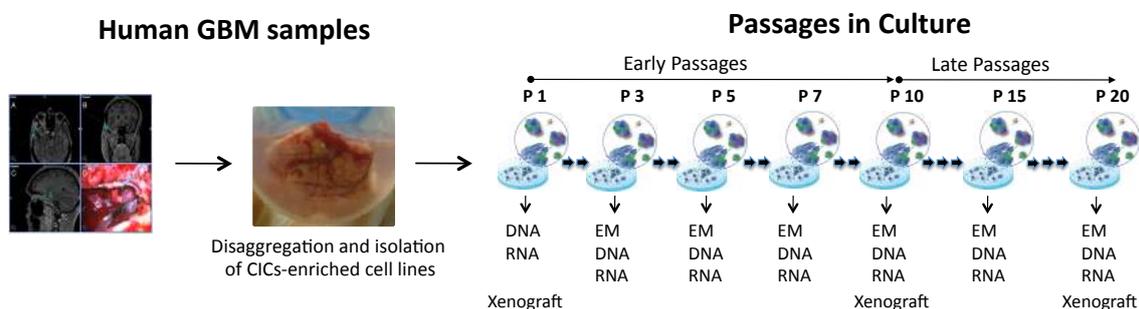


Figura 9. Diagrama mostrando el diseño experimental del presente trabajo. A partir de muestras quirúrgicas se derivaron cultivos primarios de CITs. Dichos cultivos se expandieron hasta completar 20 pases. Los 10 primeros pases (del 1 al 10) se denominaron pases tempranos y los últimos 10 pases (del 11 al 20) pases tardíos. Con objeto de estudiar la evolución de los cultivos primarios *in vitro*, en los pases impares del 1 al 10 y en el 15 y 20 se aisló ADN y ARN y se procesaron muestras para su análisis por TEM y CGH. En los pases 1, 10 y 20 se realizaron xeno-implantes en cerebro de ratones nude.

6.4. Análisis comparativo de proliferación en relación al número de pases en cultivo.

La primera cuestión a la hora de estudiar posibles alteraciones en cultivos primarios a lo largo de los pases es analizar la posible influencia de las condiciones de cultivo en la capacidad de proliferación de dichos cultivos primarios. Así pues realizamos ensayos de viabilidad celular, durante los 12 primeros días después de cada pase, en los pases 3, 5 y 7 (pases tempranos) y más tarde, en los pases 11, 15 y 20 (pases tardíos). Todos los ensayos se

llevaron a cabo por cuadruplicado y se elaboró un histograma representando los valores medios para cada uno de los cultivos primarios seleccionados, tanto en pases tempranos como en pases tardíos. En el caso de GBM38 no observamos cambios estadísticamente significativos en el patrón de proliferación. En el caso de GBM18, observamos que el índice de proliferación disminuyó ligeramente en pases tardíos, mientras que en el caso de GBM27 los pases tardíos mostraban un aumento en el índice de proliferación estadísticamente significativo (**Figura 10**).

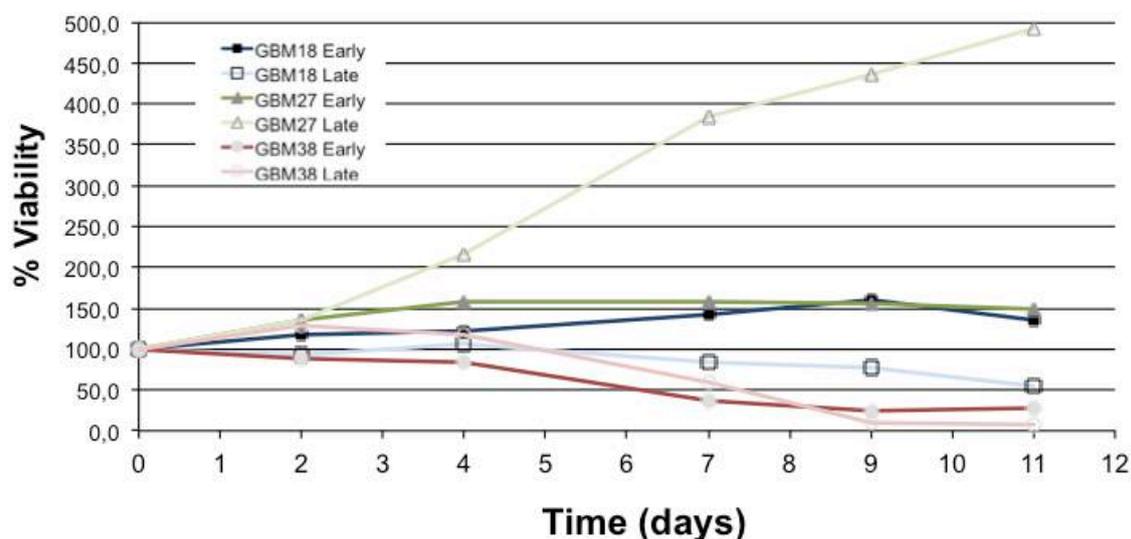


Figura 10. Análisis comparativo de proliferación entre pases bajos y pases altos de GBM18, GBM27 y GBM38.

6.5. Caracterización morfológica de los diferentes cultivos primarios de CITs de gliomas de alto grado en relación con el número de pases en cultivo.

Una vez observados cambios en el patrón de proliferación en dos de los tres cultivos primarios, llevamos a cabo un estudio comparativo tanto del patrón de formación de esferas como de las células que forman parte de dichas esferas. En primer lugar analizamos la forma y el tamaño de las esferas así como la adhesión al sustrato y/o su crecimiento en suspensión en pases tempranos y en pases tardíos, utilizando microscopía óptica de transmisión. Observamos que en todos los casos se reproducía el mismo patrón de formación de esferas que el observado, y descrito en detalle, inicialmente en

pase uno (**Figura 1A**). Continuamos con el estudio analizando 10 esferas de cada pase mediante microscopía electrónica de transmisión. Observamos, que a nivel ultraestructural, los tres tipos de cultivos primarios reproducían en general las mismas características en pases tempranos y en pases tardíos. Sin embargo encontramos diferencias comunes a los tres tipos de cultivos. Mientras que en pases tempranos la mayoría de esferas tumorales presentaban una organización arquitectural compacta, en pases tardíos aparecía un 50% de esferas con grandes espacios intercelulares y células con un gran número de prolongaciones citoplasmáticas, que aumentaban la superficie de membrana. Estas prolongaciones de membrana de diferentes células en ocasiones aparecían intercaladas, ayudando al mantenimiento de la arquitectura de la esfera (**Figura 11A-B**). Además, encontramos en un número alto de células, estructuras de doble membrana en las proximidades de la membrana nuclear, típicas estructuras de células con alta tasa de proliferación (**Figura 11C-D**). Finalmente, observamos que en pases tardíos la mayoría de las células presentaban alteraciones morfológicas en mitocondrias, donde las crestas internas habían desaparecido, disminuido de tamaño o presentaban una organización arquitectural atípica, una característica consistente con cambios metabólicos (**Figura 11C**).

6.6. Descripción del grado de diseminación de CITs xeno-implantadas en cerebro de animales de experimentación: evaluación de posibles diferencias en el patrón de diseminación en relación con el número de pases en cultivo.

Con objeto de estudiar cambios en la población de cultivos primarios de CITs, durante los 20 primeros pases, que se pudieran trasladar en un comportamiento diferente en términos de proliferación y diseminación *in vivo*, llevamos a cabo xeno-implantes en el cuerpo estriado de ratones inmunodeprimidos nude. Dichos xeno-implantes se realizaron en los dos primeros pases y, para llevar a cabo estudios comparativos, en los pases 10, 15 y 20. En cada uno de estos pases, células de cada uno de los tres cultivos primarios se implantaron en 10 ratones diferentes. Pasadas 12 semanas, los ratones fueron sacrificados, se extrajeron los cerebros, se fijaron y se cortaron

en el vibratomo en secciones coronales de 50 μm . Posteriormente para identificar la presencia de células humanas, se llevaron a cabo inmunohistoquímicas con un anticuerpo anti-*human nuclei*. Se observó que, en todos los casos, las células de cultivos primarios eran capaces de sobrevivir en el cerebro de ratón, dando lugar a formaciones tumorales. GBM18 y GBM27, al igual que se observó en pases tempranos, las CITs no forman nódulos, sino que aparecían diseminadas por todo el parénquima cerebral del hemisferio ipsilateral y, en menor grado, en el contralateral. Comprobamos además, que GBM27 utilizaba principalmente los haces de mielina como vía de diseminación, mientras que GBM18 utilizaba además vasos sanguíneos. En el caso de GBM38, se observó que en pases altos seguían formando tumores nodulares, de mayor o menor tamaño, pero raramente se encontraban células migrando a través de haces de mielina o vasos sanguíneos (**Figura 2**). Así pues, no se observó diferencias en el patrón de proliferación y diseminación en CITs de los tres cultivos estudiados, entre pases tempranos y pases tardíos.

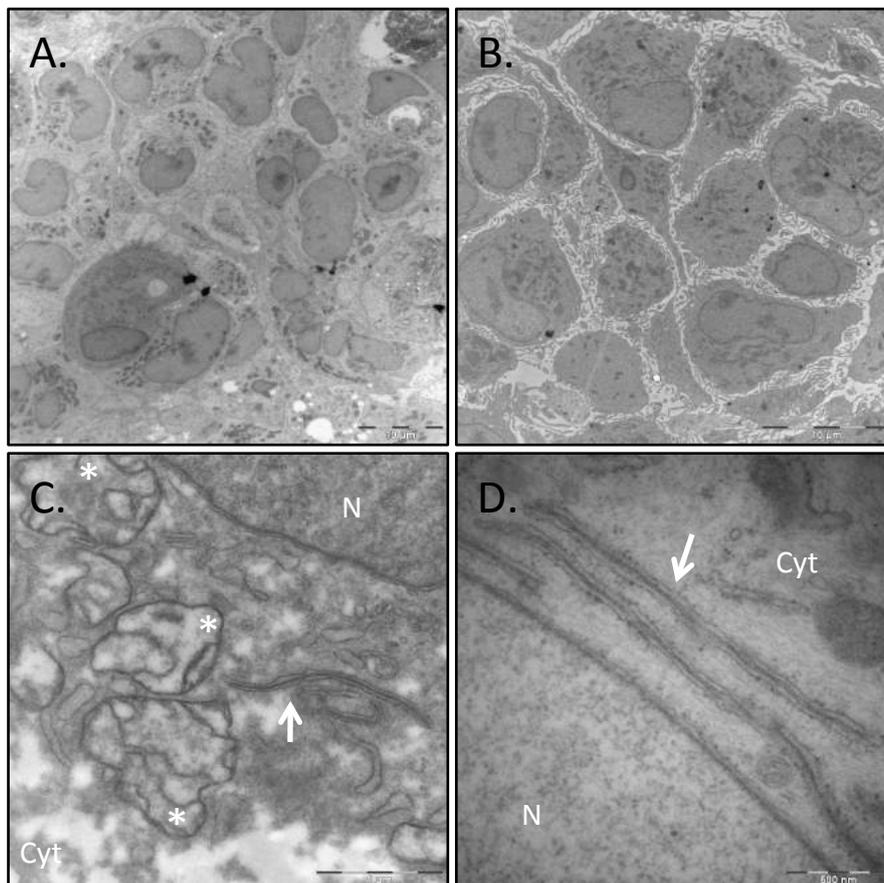


Figura 11. Alteraciones morfológicas encontradas en pases tardíos de cultivos primarios de GBM18, GBM27 y GBM38. **A.** Células agrupadas de forma compacta dentro de la neuroesfera. **B.** Después de varios pases en cultivo, en muchas esferas las células aparecen separadas unas de otras, con interdigitaciones que las mantienen unidas dentro de la neuroesfera. **C***, indica la localización de mitocondrias. N indica la localización del núcleo. Flecha blanca indica estructuras atípicas de doble membrana. **D,** Cyt, indica citoplasma, N, indica núcleo y flecha blanca indica localización de estructuras de doble membrana en regiones cercanas a la membrana nuclear.

6.7. Evaluación de la expresión de genes relacionados con estados de diferenciación e indiferenciación en relación con el número de pases en cultivo.

La presencia de CIT en Gliomas de alto grado fue demostrada en 2003 por el grupo del Dr. Peter Dirck en base al aislamiento de dichas células utilizando CD133 como marcador de superficie, y durante la última década, dicho marcador se ha utilizado de forma extensiva para la identificación de CITs. Sin embargo, más recientemente, otros autores han identificado subpoblaciones de células con características similares a CITs, a partir de muestras de gliomas de alto grado, en base a marcadores como SSEA-1 o CD44 entre otros. Por otro lado, una de las características de dichas células es su estado indiferenciado, por lo que expresan marcadores de indiferenciación de células madre como *OCT 3/4*, *SOX2* y *BMI1* o más específicos de células madre neuronales como *NESTIN* o *MELK*. Así pues, nos preguntamos si durante los pases en cultivo, podría haber cambios en la expresión de dichos genes, junto con otros específicos de diferenciación a neurona, astrocito y oligodendrocito. Dicha información nos permitiría descubrir si las condiciones de cultivo permiten el desarrollo de poblaciones indiferenciadas de CITs o, por el contrario, pierden el estado indiferenciado con el tiempo y diferencian a alguno de los linajes celulares del parénquima cerebral. Para llevar a cabo dicho estudio diseñamos cebadores capaces de reconocer y amplificar específicamente secuencias de ARNm de los genes de interés. Validamos dichos cebadores mediante la utilización de ARNm procedente de células control y, finalmente, llevamos a cabo un estudio comparativo de la expresión de dichos genes, utilizando QRT-PCR, en pases bajos y pases altos de los tres cultivos primarios analizados en el presente trabajo (**Figura 12**). En general

observamos un aumento significativo en la expresión de los genes de indiferenciación acompañado de una bajada en los niveles de expresión de genes de diferenciación en los tres cultivos primarios estudiados. La expresión de *CD133* aumenta en pases altos en GBM18 y GBM27, no así en GBM38, donde se mantiene constante a niveles bajos en todos los pases. Este hecho es consistente con la pérdida de heterogeneidad de la región de DNA genómico donde se localiza dicho gen. La expresión de *CD44* aumenta en pases altos en los tres cultivos primarios, mientras que *SSEA-1* sólo aumenta en el caso de GBM27. Con respecto a marcadores generales de células madre (*OCT3/4*, *SOX2*, *BMI1*) y más específicos de células madre neuronales (*NESTIN* y *MELK*), todos sin excepción aumentan su expresión de forma significativa en pases altos en los tres cultivos primarios (**Figura 12A**). Por último observamos que los marcadores de diferenciación de astrocitos (*GFAP* y *S100*) oligodendrocitos (*PDGFR α* y *CNPase*) y neuronas (*β III-TUB* y *MAP2*) disminuyen sus niveles de expresión en pases altos en GBM27, y lo mismo ocurre en el caso de los otros dos cultivos primarios, con la excepción de los marcadores de oligodendrocitos, cuya expresión se mantiene constante en GBM18 y aumenta en GBM38 (**Figura 12B**).

6.8. Detección y análisis de alteraciones cromosómicas en relación con el número de pases en cultivo.

Una de las características fundamentales de células tumorales, es que están sujetas a un alto grado de eventos de inestabilidad cromosómica debido a deficiencias en rutas como la reparación y recombinación de ADN, puntos de control del ciclo celular y apoptosis. Por lo tanto, diferencias en el conjunto de alteraciones genéticas en CITs que afecten a dichas rutas, puede dar lugar a CITs con diferentes ratios en nuevos eventos de inestabilidad cromosómica, entre diferentes tumores, pero también dentro de un mismo tumor. Una vez en cultivo, las condiciones de cultivo pueden afectar también a los ratios en nuevos eventos de inestabilidad cromosómica, dando lugar a cultivos primarios que se parecen poco a los tumores de origen y que por tanto, condicionaría su utilización como modelos preclínicos para la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos.

Con esta idea en mente, en el presente trabajo se propuso realizar un estudio comparativo sobre la aparición de eventos de inestabilidad cromosómica en GBM18, GBM27 y GBM38 durante los 20 primeros pases en cultivo. Para ello tomamos muestras de ADN en los pases 1, 5, 7, 10, 15 y 20 y estudiamos las posibles alteraciones cromosómicas mediante técnicas de Hibridación Genómica Comparada (CGH). En primer lugar observamos un número importante de alteraciones cromosómicas en los tres cultivos primarios ensayados. Entre las diferentes alteraciones observadas, en todos los pases analizados en los tres cultivos primarios, encontramos amplificaciones en regiones del Cromosoma 7, donde se localiza EGFR, y deleciones en el cromosoma 10, coincidiendo con la localización de PTEN. Dichas alteraciones son características de gliomas de alto grado.

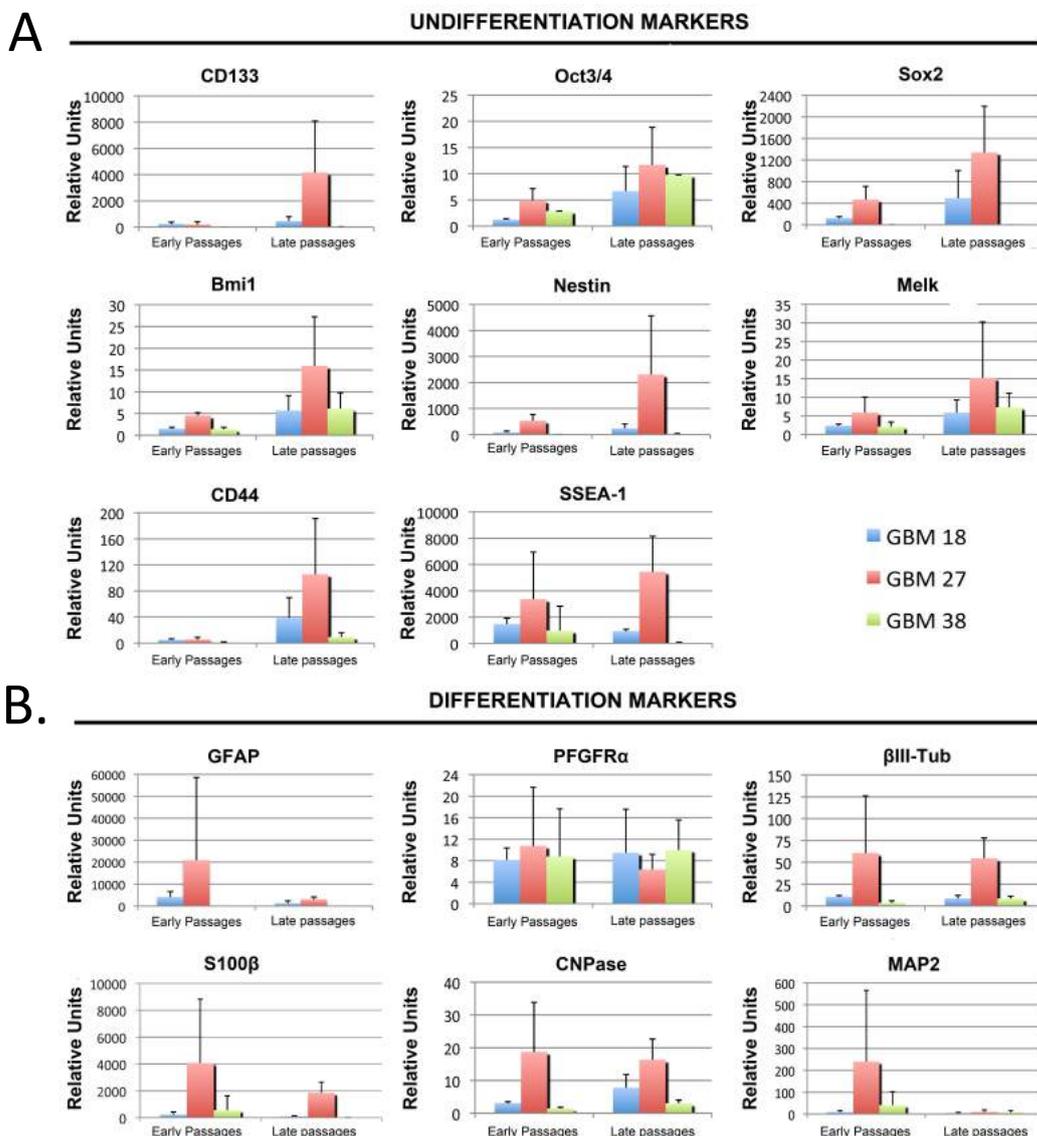


Figura 12. Análisis de expresión de genes de indiferenciación y genes de diferenciación en GBM18, GBM27 y GBM38 en pases tempranos y pases tardíos. Los niveles de expresión están expresados en unidades relativas. La barra de error muestra la desviación estándar de todos los experimentos realizados.

Cuando realizamos un estudio comparativo de las alteraciones cromosómicas de GBM18 durante los 20 primeros pases, observamos que GBM18 es un cultivo homogéneo en términos de alteraciones cromosómicas. Observamos alteraciones, por ganancia o pérdida en 18 cromosomas. Del total de alteraciones cromosómicas, sólo el 10 % fueron amplificaciones (en cromosomas 3, 7 y 20) el 90 % restante fueron deleciones en heterocigosis (89%) y, en menor medida en homocigosis (11%). Sin embargo, lo más interesante fue que no se observaron nuevas alteraciones en los 20 pases analizados. Así pues, GBM18 era un cultivo estable a nivel cromosómico, en nuestras condiciones de cultivo, durante al menos 20 pases (**Tabla 2**).

A continuación estudiamos los eventos de inestabilidad cromosómica de GBM27 durante los 20 primeros pases en cultivo. La observación más relevante es la aparición de eventos de inestabilidad cromosómica entre los pases 1 y 5 y entre los pases 7 y 10, manteniéndose estable hasta el pase 20. Observamos alteraciones en 17 cromosomas. De las 36 alteraciones cromosómicas observadas, 11 (31%) son amplificaciones; el resto son deleciones (69%), principalmente en heterocigosis (89%) y en menor medida en homocigosis (11%). Casi el 50% (4) de las amplificaciones se observaron solo en el pase 1 y desaparecieron a partir del pase 5. De estas 4 amplificaciones 3 de ellas aparecieron en aproximadamente el 30% de las células. A partir del pase 3 aparecen además dos nuevas deleciones en heterocigosis dentro del cromosoma 9 que permanece estable hasta al menos el pase 20. Entre los pases 7 y 10 aparecen 10 nuevas deleciones (2 de ellas en homocigosis). Estas nuevas deleciones no afectan al 100% de la población, sino a porcentajes que oscilan en torno al 30%. A partir del pase 10 la población permanece casi constante en términos de estabilidad cromosómica, con la excepción de una pequeña deleción en el cromosoma 19 detectada en el pase 15 en el 30% de la población (**Tabla 3**).

Finalmente estudiamos los eventos de inestabilidad cromosómica en GBM38 durante los primeros 20 pases en cultivo. Observamos que aparecen alteraciones en todos los cromosomas en al menos alguno de los pases analizados. Del total de alteraciones observadas en los diferentes pases (49) el 45% son amplificaciones y el 55% restante son deleciones, de ellas sólo una en homocigosis, correspondiente a la región p21.3 del cromosoma 9, delecionada también en homocigosis en GBM18 y GBM27. La mayoría de los eventos de inestabilidad cromosómica ocurrieron entre los pases 1 y 3 y entre los pases 10 y 15. Al igual que ocurriera en GBM27, 4 de las duplicaciones observadas en pase 1 desaparecen en pase 5. Sin embargo, a diferencia de GBM27, en pase 5 aparecen 2 nuevas duplicaciones y 5 deleciones, la mayoría en sólo un porcentaje de la población. Algunas de las alteraciones en subpoblaciones de GBM38, aparecen y desaparecen en los análisis realizados entre los pases 5 y 10. Por último entre los pases 15 y 20 la población aparece homogénea y estable, con un sólo evento de inestabilidad cromosómica correspondiente a una deleción en el cromosoma 3 en pase 20 (**Tabla 4**).

Tabla 2. Análisis de alteraciones cromosómicas mediante Hibridación Genómica Comparada (CGH) en células de GBM18 durante los 20 primeros pases en cultivo. En la tabla se indican únicamente los cromosomas en los que se han observado alteraciones, la localización y tamaños de dichas alteraciones y los pases en los que se han observado. Clave: -2, delección en homocigosis; -1, delección en heterocigosis; 1, ganancia en heterocigosis; 2 ganancia en homocigosis.

Chr. #	Cytoband	UCSC hg18 Start	UCSC hg18 Stop	Size (Mb)	GBM18 P1	GBM18 P5	GBM18 P7	GBM18 P10	GBM18 P15	GBM18 P20
chr1	p33	49403959	49860501	0,46	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr1	q32.3 - q44	2,1E+08	2,45E+08	34,37	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr2	q24.2	1,6E+08	1,6E+08	0,43	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr2	q37.1	2,34E+08	2,34E+08	0,79	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr3	p21.31	47553726	47602749	0,05	1	1	1	1	1	1
chr3	q13.31	1,17E+08	1,18E+08	0,43	-2	-2	-2	-2	-2	-2
chr3	q13.33	1,21E+08	1,21E+08	0,16	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr4	q25	1,14E+08	1,14E+08	0,14	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr4	q31.23 - q31.3	1,5E+08	1,51E+08	1,85	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr4	q32.1	1,56E+08	1,58E+08	1,77	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr4	q32.2 - q32.3	1,64E+08	1,65E+08	0,34	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr4	q32.3	1,66E+08	1,69E+08	2,27	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr4	q34.3	1,8E+08	1,81E+08	1,07	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr4	q35.1 - q35.2	1,83E+08	1,88E+08	5,18	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr5	q33.3 - q34	1,57E+08	1,64E+08	7,10	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr6	q22.31	1,19E+08	1,19E+08	0,34	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr7	p22.3 - q36.3	149268	1,59E+08	158,45	1	1	1	1	1	1
chr9	p21.3	21968146	21980722	0,01	-2	-2	-2	-2	-2	-2
chr10	p15.3 - q26.3	138206	1,35E+08	135,12	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr11	q14.1	78303246	79188879	0,89	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr12	p13.2 - p13.1	12393482	12669535	0,28	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr12	q23.1	99130349	99228987	0,10	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr14	q11.2 - q32.33	19508845	1,06E+08	86,82	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr15	q26.1 - q26.3	90198224	97613657	7,42	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr17	p13.1	7401533	7517547	0,12	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr17	q11.2	26338949	26783160	0,44	-2	-2	-2	-2	-2	-2
chr18	p11.32 - q23	170029	76083258	75,91	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr20	p13 - q13.33	18380	62363774	62,35	1	1	1	1	1	1
chr22	q11.1 - q13.33	14433473	49525130	35,09	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chrX	q28	1,53E+08	1,54E+08	1,44	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Tabla 3. Análisis de alteraciones cromosómicas mediante Hibridación Genómica Comparada (CGH) en células de GBM27 durante los 20 primeros pases en cultivo. En la tabla se indican únicamente los cromosomas en los que se han observado alteraciones, la localización y tamaños de dichas alteraciones y los pases en los que se han observado. Clave: -2, delección en homocigosis; -1, delección en heterocigosis; 1, ganancia en heterocigosis; 2 ganancia en homocigosis. ^, 10% de la población; *, 25% de la población; ** 50% de la población.

Chr. #	Cytoband	UCSC hg18 Start	UCSC hg18 Stop	Size (Mb)	GBM27 P1	GBM27 P5	GBM27 P7	GBM27 P10	GBM27 P15	GBM27 P20
chr1	p36.33 - p36.12	554068	22913633	22,36	+1*					
chr1	p36.12 - p35.3	23113417	27820370	4,71	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr1	p35.3-q44	27960490	247118482	219,16	+1*					
chr1	q41 - q42.12	2,2E+08	223784914	3,90				-1*	-1*	-1*
chr2	p25.3-q37.3	208595	242690037	242,48	+1*	1	1	+1*	+1*	+1*
chr3	p26.3-q29	224527	199288217	199,06	1	1	1	+1*	+1*	+1*
chr5	p15.33-q23.2	148043	122656925	122,51	1	1	1	+1*	+1*	+1*
chr6	q26 - q27	1,64E+08	167695365	3,83				-1*	-1*	-1*
chr7	p22.3 -q36.3	149068	158602499	158,45	+1*	1	1	1	1	1
chr8	p23.3 -q24.3	445082	146201771	145,76	+1*					
chr9	p24.3 -p22.1	204167	19540325	19,34		-1	-1	-1	-1	-1
chr9	p22.1 - p21.3	19587033	24874189	5,29	-2	-2	-2	-2	-2	-2
chr9	p21.3 - p13.1	25081725	39277118	14,20		-1	-1	-1	-1	-1
chr9	q13 - q34.3	70327267	140073968	69,75	2	1	1	1	1	1
chr10	p15.3 - p11.21	138206	38166900	38,03	-1*	-1**	-1^	-1*	-1*	-1*
chr10	p11.23 - p11.22	30768143	33431691	2,66				-2*	-2*	-2*
chr10	p11.22- p11.21	33531030	38468194	4,94				-1*	-1*	-1*
chr10	q11.21 -q26.3	44669560	134446451	89,78	-1*	-1**	-1^	-1*	-1*	-1*
chr10	q23.2 - q23.31	89540133	90814414	1,27				-2*	-2*	-2*
chr10	q23.31- q26.3	90955266	134446451	43,49				-1*	-1*	-1*
chr12	p13.33 -q24.33	179123	132193660	132,01	1					
chr14	q11.2 - q32.33	19508845	105024178	85,52	+1*					
chr14	q12	28684841	29767186	1,08	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr15	q14 - q15.1	32511272	38445780	5,93				-1*	-1*	-1*
chr16	q12.1	47505319	48408783	0,90	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr16	q12.1 - q22.1	50843158	68534348	17,69	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr16	q22.3 - q23.1	73148905	75674285	2,53	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr17	q11.2 - q25.3	26663307	78623230	51,96	1	1	1	+1*	+1*	+1*
chr19	q13.32	50975367	53079022	2,10	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr19	q13.33	55600649	56342690	0,74					-1*	-1*
chr19	q13.33	55600449	55704086	0,10	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr19	q13.33 - q13.41	56275383	58646276	2,37	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr19	q13.33	56392998	56687199	0,29	-2	-2	-2	-2	-2	-2
chr21	q22.11	33246346	33799862	0,55	-1*	-1	-1	-1	-1	-1
chr22	q11.1 - q11.22	15835035	21010211	5,18				-1*	-1*	-1*
chr22	q12.3 - q13.1	33442011	37176202	3,73				-1*	-1*	-1*

Tabla 4. Análisis de alteraciones cromosómicas mediante Hibridación Genómica Comparada (CGH) en células de GBM38 durante los 20 primeros pases en cultivo. En la tabla se indican únicamente los cromosomas en los que se han observado alteraciones, la localización y tamaños de dichas alteraciones y los pases en los que se han observado. Clave: -2, delección en homocigosis; -1, delección en heterocigosis; 1, ganancia en heterocigosis; 2 ganancia en homocigosis. ^, 10% de la población; *, 25% de la población; ** 50% de la población.

Chr. #	Cytoband	UCSC hg18 Start	UCSC hg18 Stop	Size (Mb)	GBM38 P1	GBM38 P5	GBM38 P7	GBM38 P10	GBM38 P15	GBM18 P20
chr1	p36.13	17483078	17914454	0,33	+1	+1	+1	+1	+1	+1
chr1	p34.3 - p34.2	36835076	39875175	3,04	+1	+1	+1	+1	+1	+1
chr1	p21.1 -q44	106142485	247179291	141,04		+1	+1	+1	+1	+1
chr1	p13.1	117112691	117379771	0,27	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr2		29193	141703284	141,67		-1*	-1^			
chr2	p25.3 - p16.1	208795	56540075	56,51					+1	+1
chr2		57384961	242690037	185,31					-1	-1
chr2	q22.1 - q22.2	142284207	144035497	2,70	+1	+1	+1	+1		
chr2	q22.1 - q37.3	142284207	242169652	100,41	+1					
chr3	p21.31	45516991	45964687	0,45	+1	+1	+1	+1	+1	+1
chr3		76211888	90264177	14,05	-1*	-1*	-1*			
chr3		95088205	199288217	104,20	+1*					-1
chr4	p16.3-q35.2	62447	191121344	191,06	-1*	-1	-1	-1	-1	-1
chr5	p15.33 - p15.	148043	9683273	9,53	+2	+2	+2	+2	+2	+2
chr5	q31.2	137569709	137879815	0,41					+1	+1
chr5	p15.2 - q35.3	10120817	180617107	170,50	+1	+1	+1	+1		
chr6		204528	170734227	170,53			-1^	-1*		
chr6		27882726	27988302	0,11	-1	-1	-1	-1		
chr6	q15	87855835	88919083	0,89	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr6		145883327	146097565	0,21				-1*	-1	-1
chr7	p22.3 - q36.3	149268	158781397	158,63	+1	+1	+1	+1		
chr7	p22.1	5993160	6344349	0,29					+1	+1
chr7		62153588	79562970	17,41					+1	+1
chr8	p23.3 - q13.2	181530	70029837	69,85		-1	-1	-1	-1	-1
chr9	p24.3 - p21.1	204367	28735046	28,53	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr9	p21.3	21844914	21999182	0,15	-2	-2	-2	-2	-2	-2
chr10	p15.3 -q26.3	138206	135254513	135,12	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr11	p15.5 - p14.3	192958	22892819	22,49					+1	+1
chr11		21322916	84398989	63,08		-1*	-1*	-1*		
chr11	q14.1 - q25	82843821	133761259	49,31		-1	-1	-1	-1	-1
chr12	p13.33 -q24.3	49967	132278059	132,23	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr13		18601703	114077122	95,48			-1^	-1*		
chr13		31574116	31738692	0,16	-1	-1	-1			
chr14	q12 - q31.1	28974471	78816279	49,84	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr15	q11.2 - q26.3	20418129	100168859	81,06	+1**	+1**	+1*			
chr16	q24.2	85927761	86371915	0,96	+1	+1	+1	+1	+1	+1
chr17	p13.3- q25.3	84287	78623230	78,57		-1	-1	-1	-1	-1
chr17	q23.2	57344164	58191068	0,85	+1					
chr18	p11.32 - q23	170229	76083117	75,91	-1					
chr18	p11.32 -q11.2	170229	17760271	18,46		+1**	+1**	+1**	+1	+1
chr18		18770696	76083117	57,31		-1*	-1*	-1**		
chr19	q13.43	63043564	63784382	0,74	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr20	p13 - q13.33	18580	62363633	62,35	+1	+1	+1	+1	+1	+1
chr21	q11.1 - q22.3	10013263	46892352	36,88	-1	-1	-1	-1	-1	-1
chr22	q11.1 - q13.3	15908242	49335558	35,09	+1*	-1			-1	-1
chr22	q11.1 - q13.2	15908242	40007382	25,57						
chr22	q13.2	40064271	41312679	1,25			+1	+1		
chr22	q13.2 - q13.3	41336148	49525130	8,19			-1	-1		
chrX	p22.33-q28	2782031	153475911	150,69					-1	-1

Considerando la gran diferencia en el número de eventos de inestabilidad cromosómica observados en los tres cultivos primarios, y que el aumento en la ratio de dichos eventos se debe a alteraciones en rutas de reparación y recombinación de ADN, nos propusimos analizar los fragmentos cromosómicos ganados o perdidos en los que se localizan los genes claves en dichas rutas. Primero seleccionamos genes de las rutas de reparación sobre la marcha, de reparación mediada por recombinación homóloga, de reparación de mal apareamiento, reparación por escisión de nucleótido y reparación por escisión de base además de los puntos de control del proceso de mitosis. En total examinamos la localización de 40 genes. Cuando estudiamos las posibles alteraciones en estos genes en GBM18, observamos que tan sólo 8 de los 40 genes estaban alterados por pérdida o ganancia de ADN, siendo la más afectada la ruta de reparación de mal apareamiento. Estas alteraciones, sin embargo, permanecieron constantes a lo largo de los 20 primeros pases. A continuación estudiamos la localización de dichos genes en GBM27. Observamos que 18 de los 40 genes estaban alterados en pases tempranos. En todos los casos de las rutas de reparación de ADN, las alteraciones en los genes analizados se debían a ganancia de ADN. Únicamente en los genes relacionados con los puntos de control de mitosis aparecieron pérdidas de ADN en *BUB3*, a lo largo de todos los pases, y en *BUB1B* en pases tardíos. Por último estudiamos la localización de dichos genes en GBM38. Observamos que 14 de los 40 genes seleccionados estaban alterados en pases tempranos; sólo los genes relacionados con las rutas de reparación por escisión de nucleótido y de base no estaban alterados. Sin embargo, durante los 20 primeros pases aparecieron nuevas alteraciones permanentes y temporales tanto por ganancia como por pérdida de ADN. Al cabo de los 20 pases aparecieron 32 de los 40 genes alterados; el 35% debido a ganancias de ADN mientras que el 65% debido a pérdidas de ADN (**Tabla 5**).

Tabla 5. Selección de genes clave en rutas de reparación de ADN y puntos de control de mitosis, localización y alteraciones observadas en pases 1, 5, 7, 15 y 20 en GBM18, GBM27 y GBM38. Clave: L1, pérdida de una copia de ADN, G1, ganancia de una copia de ADN.

Pathway	Location	GBM 18					GBM 27					GBM 38					Altered genes Ratio (P1)			Altered genes Ratio (over all passages)													
		P1	P5	P7	P10	P15	P20	P1	P5	P7	P10	P15	P20	P1	P5	P7	P10	P15	P20	GBM18	GBM27	GBM38	GBM18	GBM27	GBM38								
Non-homologous end-joining																																	
KU70 (XRCC6)	22q13.2	L1	L1	L1	L1	L1	L1	N	N	N	N	N	N	N	N	L1	L1	N	N	1/5	3/5	2/5	1/5	3/5	5/5								
KU80(XRCC5)	2q35	N	N	N	N	N	N	G1*	G1	G1	G1*	G1*	G1*	G1	N	N	N	N	N														
DNA-PKcs(XRCC7)	8q11	N	N	N	N	N	N	G1	N	N	N	N	N	N	L1	L1	L1	L1	L1														
XRCC4	5q14.2	N	N	N	N	N	N	G1	G1	G1	G1*	G1*	G1*	G1	G1	G1	G1	G1	N														
DNA Ligase IV	13q33-q34	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	L1*	L1*	N	N														
Homologous recombination-mediated repair																																	
BRCA1	17q21	N	N	N	N	N	N	G1	G1	G1	G1	G1	G1	N	L1	L1	L1	L1	L1														
BRCA2	13q12.3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	L1*	L1*	N	N														
RAD50	5q31	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	G1	G1	G1	G1	N														
RAD51	15q15.1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	G1*	G1*	G1*	N	N														
MRE11	11q21	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	L1	L1	L1	L1	L1														
NBS1	8q21	N	N	N	N	N	N	G1*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	1/10	3/10	4/10	1/10	3/10	9/10								
ATM	11q22-q23	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	L1	L1	L1	L1	L1														
ATR	3q22-q24	N	N	N	N	N	N	G1	G1	G1	G1*	G1*	G1*	G1*	N	N	N	N	L1														
CHEK1	11q24.2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	L1	L1	L1	L1	L1														
CHEK2	22q11; 22q12.1	L1	L1	L1	L1	L1	L1	N	N	N	N	N	N	N	G1*	L1	L1	L1	L1														
Mismatch repair																																	
Mut5a (MSH2/MSH6)																																	
MSH2	2p21	N	N	N	N	N	N	G1*	G1	G1	G1*	G1*	G1*	N	L1*	L1*	N	N															
MSH6	2p16	N	N	N	N	N	N	G1*	G1	G1	G1*	G1*	G1*	N	L1*	L1*	N	N															
Mut5b (MSH2/MSH3)																																	
MSH3	5q11-q12	N	N	N	N	N	N	G1	G1	G1	G1*	G1*	G1*	G1	G1	G1	G1	N															
MutLa (MLH1/PMS2)																																	
MLH1 (rev en GBM38)	3p21.3	N	N	N	N	N	N	G1	G1	G1	G1*	G1*	G1*	N	N	N	N	N	3/7	7/7	3/7	3/7	7/7	6/7									
PMS2	7p22.2	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1*	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	N															
MutLb (MLH1/MLH3)																																	
MLH3	14q24.3	L1	L1	L1	L1	L1	L1	G1*	N	N	N	N	N	N	L1	L1	L1	L1	L1														
Exo1	1q42-q43	L1	L1	L1	L1	L1	L1	G1*	N	N	N	N	N	N	G1	G1	G1	G1	G1														
Nucleotide excision repair																																	
DDB1	11q12-q13	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	L1*	L1*	L1*	N	N													
DDB2	11p11-12	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	L1*	L1*	L1*	N	N													
XPC	3p25.1	N	N	N	N	N	N	G1*	G1	G1	G1*	G1*	G1*	N	N	N	N	N	N														
TFIIH	11p15.1-p14	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	G1	G1													
XPB (The p89 subunit of TFIIH)	2q21	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0/9	1/9	0/9	0/9	1/9	4/9							
XPD(component of TFIIH)	19q13.3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N													
RPA	17p13.3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	L1	L1	L1	L1	L1														
ERCC1	19q13.32	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N													
ERCC4	16p13.12	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N													
Base excision repair																																	
PARP1	1q41-q42	L1	L1	L1	L1	L1	L1	G1*	N	N	N	N	N	N	G1	G1	G1	G1	G1	1/2	1/2	0/2	1/2	1/2	1/2								
XRCC1	19q13.2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N													
Mitotic checkpoint																																	
BUB1	2q14	N	N	N	N	N	N	G1*	G1	G1	G1*	G1*	G1*	N	L1*	L1*	N	N	N														
BUB1B	15q15	N	N	N	N	N	N	N	N	L1*	L1*	L1*	L1*	G1*	G1*	G1*	N	N	N														
BUB3	10q26	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L1*	L1*	L1*	L1*	L1*	L1*	L1	L1	L1	L1	L1	L1														
MAD1L1	7p22	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1*	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	N	2/7	3/7	5/7	2/7	4/7	7/7								
MAD2L1	4q27	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	L1*	L1	L1	L1	L1	L1													
CENPE	4q24-q25	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	L1*	L1	L1	L1	L1	L1													
AURKB	17p13.1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	L1	L1	L1	L1	L1	L1													
Ratio Altered genes/Total genes																	8/40	18/40	14/40	8/40	19/40	32/40											

6.9 Análisis de la sensibilidad de CITs a fármacos de uso común en el tratamiento de diferentes tipos de tumores en relación con el número de pases en cultivo.

Por último nos preguntamos si los cultivos primarios de CITs en gliomas de alto grado, pueden ser considerados un buen modelo preclínico de los tumores de origen para ensayar la sensibilidad a fármacos utilizados en el tratamiento estándar de gliomas de alto grado o en otros tipos de cáncer. Además, queríamos averiguar si dicho modelo puede considerarse como tal en

relación a la sensibilidad a fármacos, independientemente de los países en cultivo o si, por el contrario, se debe establecer unos límites en el número de países con objeto de asegurar su utilidad para reproducir el tumor de origen.

Con este fin, seleccionamos primero una colección de fármacos que se estaban utilizando en el momento de iniciar dicho trabajo, en el manejo habitual de gliomas de alto grado o en ensayos clínicos frente a dicho tumor. La mayoría de los fármacos seleccionados se correspondían con compuestos de segunda generación dirigidos a moléculas específicas de rutas moleculares relacionadas con la biología del tumor (**Tabla 6**).

Tabla 6. Listado de fármacos y sus dianas moleculares, utilizados en el presente trabajo para evaluar la sensibilidad de GBM18, GBM27 y GBM38 a los mismos en pases tempranos y tardíos.

Drug name	Targets
Erlotinib	EGFR Inhibitor
Cisplatino	Alquilant agent
LY294002	PI3K
Bleomycin	doble strand DNA break
AZD6244	MEK
PLX4032	B-raf inhibitor
5-Fluorouracil	DNA sintesys
Camptothecin	TopoI
Etoposide	TopoII
Taxol	Microtubule formation inhibitor
Velcade	proteosome
KU-55933	ATM inhibitor
NU7441	DNA-PK inhibitor
Nutlin-3	PARP inhibitor
NSC74859	MDM2 Inhibitor
Temsirolimus	STAT Inhibitor
Perifosine	mTOR Inhibitor
Vorinostat	AKT inhibitor
Olaparib	HDAC Inhibitor
Desatinib	SRC inhibitor
Enzastaurin	PKC inhibitor
Tipifarnib	RAS/P21 inhibitor
Temozolamide	Alquilant agent

Una vez seleccionados dichos fármacos, llevamos a cabo ensayos de viabilidad celular en presencia de diferentes concentraciones de cada fármaco. Utilizamos células de los tres cultivos primarios GBM18, GBM27 y GBM38 correspondientes a los pases 6 y 9 para pases tempranos y 16 y 18 para pases tardíos. Una vez completados los experimentos calculamos el porcentaje de viabilidad celular a 10 μ M y a 0,1 μ M para cada fármaco, con

el objetivo de poder realizar estudios comparativos entre pases tempranos y tardíos. Finalmente, calculamos el IC50 para aquellos fármacos que reducían la viabilidad celular a valores iguales o inferiores al 50% (**Figura 13**). Observamos que a 10 μ M, en los pases tardíos aparecían diferencias en la respuesta a fármacos en aproximadamente el 50% de los fármacos ensayados, en las tres

líneas celulares. Sin embargo, a 0.1 μM sólo se confirmaron dichas diferencias en 1 de 23 fármacos en GBM18, 6 de 23 para GBM27 y 4 de 23 para GBM38 (Tabla 7 y 8).

Cuando analizamos las diferencias en la respuesta a fármacos entre países tempranos y tardíos, observamos que a 10 μM la sensibilidad a agentes alquilantes aumentaba significativamente en países tardíos; en el caso de Cisplatino en todos los casos y, en el caso de temozolomida en GBM18 y GBM38. Las tres líneas se mostraron resistentes a Erlotinib y dicha respuesta no cambió entre los diferentes países estudiados. GBM18, pero no GBM27 ni GBM38, desarrolló sensibilidad a Taxol en países tardíos tanto a 10 μM como a 0.1 μM . GBM27, pero no GBM18 ni GBM38, desarrolló sensibilidad a NSC74859 tanto a 10 μM como a 0.1 μM y GBM38, pero no GBM18 ni GBM27, desarrolló resistencia a Velcade tanto a 10 μM como a 0.1 μM . GBM27 y GBM38 desarrollaron además sensibilidad a Tipifarnib tanto a 10 μM como a 0.1 μM (Figura 13 y Tablas 7 y 8).

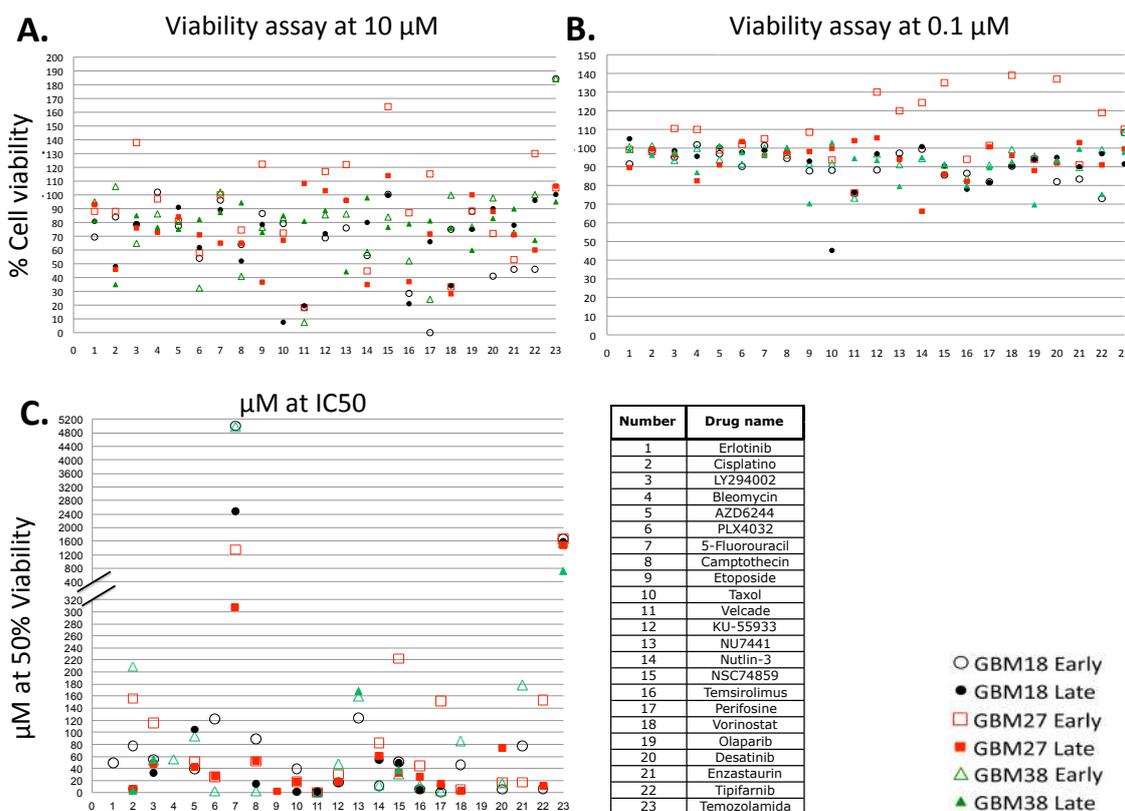


Figura 13. Ensayo de viabilidad con 23 fármacos diferentes a 10 μM y a 0,1 μM en GBM18, GBM27 y GBM38 en países tempranos y países tardíos. Los

resultados muestran el valor medio de 4 ensayos diferentes en dos pases tempranos y 4 ensayos diferentes en dos pases tardíos. **A.** Viabilidad a 10 μ M. **B.** Viabilidad a 0,1 μ M. **C.** Representación del IC50 para aquellos fármacos en los que se alcanzaba una reducción de al menos el 50% de viabilidad con las concentraciones ensayadas.

Tabla 7. Valores de IC50 obtenidos para los diferentes fármacos ensayados. NR, indica que la viabilidad celular nunca se ha reducido a valores iguales o inferiores al 50% para las concentraciones ensayadas.

		GBM18 early	GBM18 late	GBM27 early	GBM27 late	GBM38 early	GBM38 late
Number	Drug name	IC50 (μ M)					
1	Erlotinib	49	NR	NR	NR	NR	NR
2	Cisplatino	76,65	6,67	156,64	6,67	209,30	3,67
3	LY294002	55,31	32,54	115,51	47,18	53,04	53,36
4	Bleomycin	NR	NR	NR	NR	54,82	NR
5	AZD6244	39,33	104,88	52,44	43,70	93,30	NR
6	PLX4032	122,06		25,11	28,98	2,20	NR
7	5-Fluorouracil	4996,92	2498,46	1345,33	307,50	4958,49	NR
8	Camptothecin	88	15	51,90	52,6	2,15	NR
9	Etoposide	NR	NR	NR	2,3	NR	NR
10	Taxol	38,65	0,05	18,44	18,56	NR	NR
11	Velcade	0,23	0,23	0,23	NR	0,20	NR
12	KU-55933	17,12	17,14	30,09	18,71	47,54	NR
13	NU7441	124,55		NR	NR	159,13	167,84
14	Nutlin-3	10,32	55,03	82,89	60,78	11,87	NR
15	NSC74859	50,63	49,27	221,70	32,84	29,56	37,22
16	Temsirolimus	5,14	4,66	44,65	25,24	11,16	NR
17	Perifosine	0,43	11,26	151,63	15,16	2,34	NR
18	Vorinostat	46,16	2,27	4,54	4,16	85,51	NR
19	Olaparib	NR	NR	NR	NR	NR	NR
20	Desatinib	4,92	NR	16,39	73,77	15,16	NR
21	Enzastaurin	76,61	NR	16,68	NR	178,04	NR
22	Tipifarnib	6,54	NR	153,25	10,22	NR	NR
23	Temozolamida	1652,33	1583,31	1662,63	1484,41	1563,22	717,49

Además, observamos la adquisición de resistencia a Nutlin-3 y Perifosine y sensibilidad a Vorinostat en pases tardíos de GBM18 y GBM38 a 10 μ M, aunque no se reprodujo a 0.1 μ M. Por último, observamos la adquisición de resistencia a Velcade y sensibilidad a NU7441 en pases tardíos de GBM27 y GBM38 a 10 μ M, aunque en el caso de NU7441 no se reprodujo 0.1 μ M, y en el de Velcade sólo en GBM38 (**Figura 13 y Tablas 7 y 8**).

Tabla 8: Representación de las diferencias en la respuesta a los fármacos ensayados iguales o superiores a 20 puntos porcentuales entre pases tempranos y pases tardíos. Verde, reducción de la viabilidad en pases tardíos (sensibilidad). Rojo, aumento de la viabilidad en pases tardíos (resistencia).

Number	Drug name	GBM18		GBM27		GBM38	
		10 μ M	0.1 μ M	10 μ M	0.1 μ M	10 μ M	0.1 μ M
1	Erlotinib						
2	Cisplatino	Green		Green		Green	
3	LY294002			Green		Red	
4	Bleomycin	Green		Green	Green		
5	AZD6244					Red	
6	PLX4032						
7	5-Fluorouracil						
8	Camptothecin					Red	
9	Etoposide			Green			Green
10	Taxol	Green	Green				
11	Velcade			Red		Red	Red
12	KU-55933				Green		
13	NU7441	Red		Green		Green	
14	Nutlin-3	Red			Green	Red	
15	NSC74859			Green	Green		
16	Temsirolimus			Green		Red	
17	Perifosine	Red		Green		Red	
18	Vorinostat	Green				Green	
19	Olaparib						Green
20	Desatinib	Red			Green		
21	Enzastaurin	Red					
22	Tipifarnib	Red		Green	Green	Green	Green
23	Temozolamide	Green				Green	

DISCUSIÓN

Las líneas celulares derivadas de cultivos primarios de muestras quirúrgicas son una herramienta extraordinariamente útil para investigar diferentes aspectos de la biología del tumor, como son los mecanismos moleculares relacionados con proliferación, diseminación e invasividad, o la respuesta a diferentes terapias, entre otros. En este sentido, se ha propuesto que las líneas de células iniciadoras de tumores constituyen uno de los mejores modelos *in vitro* de los tumores de origen, y por tanto, la información obtenida en los ensayos realizados con dichas células, podría ser tenida en consideración, durante la toma de decisiones, en el manejo de los pacientes de origen. Sin embargo, los modelos celulares no son sistemas estáticos que respondan de igual manera, en todo momento, a estímulos externos idénticos. Por el contrario, son sistemas dinámicos dependientes de mecanismos intrínsecos de inestabilidad y sometidos a condiciones externas variables. Factores internos, como la heterogeneidad celular o la inestabilidad cromosómica, y externos, como las condiciones de cultivo, pueden generar alteraciones genéticas y/o epigenéticas que deriven en profundos cambios en aspectos biológicos como la proliferación, diseminación o invasividad, entre otros, pero también en algo más relevante en cuanto a la utilización de dichos modelos como avatares de los pacientes de origen, esto es, la respuesta a fármacos. Así pues, en el presente trabajo, se han llevado a cabo diseños experimentales que han permitido evaluar, por primera vez, cambios moleculares, alteraciones en funciones biológicas como proliferación, o diseminación y, más importante, posibles diferencias en la respuesta a fármacos, a lo largo de los 20 primeros pases en cultivo o lo que es lo mismo, durante los primeros dos años de crecimiento *in vitro*.

La presencia de una subpoblación de células, dentro de tumores gliales de alto grado, responsable de la iniciación, mantenimiento y recurrencia del tumor, fue propuesta inicialmente por el grupo del Dr. Shapiro en la década de los 80 y demostrada posteriormente por el grupo del Dr. Dirks en base al aislamiento de dichas células, utilizando el marcador de superficie CD133

^{61,63,64}. Sin embargo, algunos autores han aislado con éxito células proliferativas, con capacidad para ser expandidas *in vitro*, y características de células iniciadoras de gliomas de alto grado dentro del grupo CD133⁻ ⁶⁵, y mediante la utilización de diferentes marcadores como LiCAM, SSEA-1, A2B5 o EGFR entre otros ⁶⁶⁻⁷¹. Estos resultados indican que no hay un único marcador específico de células iniciadoras de gliomas de alto grado, y que es mucho más relevante el hecho de poder aislar cultivos primarios con características de células iniciadoras de tumores. En este contexto, a pesar de los avances en las técnicas de cultivo para poder aislar y expandir dichas células, la mayoría de los especímenes no pueden propagarse de forma infinita *in vitro*, debido principalmente a la entrada en senescencia en fases tempranas ^{88,89}. En el presente trabajo, utilizamos como método de aislamiento de células iniciadoras de gliomas de alto grado, la selección positiva de dichas células en medio mínimo utilizado previamente para el aislamiento de células madre neuronales adultas de cerebro humano, suplementado con EGF y FGF2 ^{78,85,90}. Mediante dicho método de selección hemos conseguido aislar y expandir 11 cultivos primarios de gliomas de alto grado a partir de un total de 20 muestras quirúrgicas, lo cual supone un 55% de éxito y está en consonancia con los porcentajes obtenidos por otros grupos ^{77,85,89}. Dentro de las 11 líneas generadas de cultivos primarios, observamos tres tipos de crecimiento *in vitro*, consistentes con los descritos previamente por Gunther *et al.* ⁸⁵. Sin embargo, una de las preocupaciones al utilizar este tipo de aislamiento, es la posibilidad de arrastrar células no tumorales con capacidad proliferativa, como podrían ser las células madre neuronales o progenitoras localizadas en nichos neurogénicos o dispersas por el parénquima cerebral, o de forma general, células normales del estroma asociadas al tumor. En el presente trabajo, los estudios realizados mediante hibridación genómica comparada, mostraron claramente alteraciones cromosómicas en el 100% de la población, compatibles con gliomas de alto grado, como son la ganancia de ADN genómico en el cromosoma 7, en la zona donde se localiza EGFR o la pérdida de heterogeneidad en el cromosoma 10, en la región donde se localiza PTEN. Por lo tanto, nuestros datos demuestran que el sistema de aislamiento de células iniciadoras de gliomas de alto grado utilizado, es capaz de generar cultivos enriquecidos con dichas células, al margen de los posibles marcadores

de superficie que puedan expresar, en un porcentaje elevado, a partir de muestras quirúrgicas de gliomas de alto grado. En este sentido, resulta interesante destacar la ausencia de CD133 y SSEA-1 en GBM38, debido a una pérdida de heterogeneidad en 4p15.32 y 11q21, lo que sugiere que al menos dichos marcadores no parecen ser esenciales para mantener las características de células iniciadoras de tumores, o bien apunta a la existencia de una importante diversidad de familias de células iniciadoras de gliomas de alto grado entre diferentes tumores.

Con idea de ahondar más en la diversidad de células iniciadoras de gliomas del alto grado entre diferentes tumores, llevamos a cabo un estudio morfológico mediante el análisis de cortes semifinos y ultrafinos seriados de esferas procedentes de GBM18, GBM27 y GBM38. En general, encontramos que las tres líneas están compuestas por poblaciones homogéneas de células con núcleos grandes en relación al tamaño del citoplasma, típicamente lobulado, con abundante retículo rugoso y mitocondrias. Observamos que en GBM38, pero sobre todo en GBM18, algunas células presentan un número elevado de inclusiones de hidratos de carbono. Estas inclusiones aumentan en tamaño en células interiores de la esfera o unidas de forma más compacta. Dichos depósitos suelen ser dependientes de Golgi y ser secretados al exterior. Sin embargo, observamos que en estas células se acumulan en el citoplasma, seguramente por un fallo en los mecanismos de secreción. Estos acúmulos tan grandes hacen difícil que puedan dividirse correctamente por lo que, dentro de cada una de estas poblaciones, la categoría de célula iniciadora de tumores deberíamos buscarla en aquellas células que no tuvieran dichos acúmulos. Posiblemente, las células iniciadoras de tumores, dentro de la neuroesfera, se encuentren entre la población con menos inclusiones, algo más electrodensas. En este contexto, encontramos células en división tanto en la periferia como en el interior de la esfera. Estas células presentan muy pocas inclusiones y son candidatas a células iniciadoras de tumores con capacidad para mantener el resto de la población. Posiblemente a medida que aumenta el número y tamaño de las inclusiones, dichas células irán perdiendo la capacidad de dividirse. Encontrar marcadores específicos en esta subpoblación, dentro de la esfera, resultaría de gran interés para llegar a identificar las células con capacidad para iniciar y mantener el tumor.

Cuando realizamos un estudio morfológico comparativo de diferentes esferas, dentro de cada línea, en pases tempranos y tardíos, no encontramos ninguna diferencia significativa en cuanto a diversidad celular, lo que significa, que los posibles cambios genéticos o epigenéticos a lo largo de los pases en cultivo, o la posible existencia de heterogeneidad celular, no tienen un reflejo en cambios morfológicos significativos. Sin embargo, si que se encontraron cambios morfológicos similares en las tres líneas celulares cuando comparamos pases tempranos y tardíos. A nivel de esfera, nos encontramos con un número creciente de esferas con mayores espacios intercelulares y aumento de microvellosidades intercaladas que sin embargo no se entrelazaban. Este efecto podría estar relacionado con la adaptación al medio de cultivo, dejando más espacios para que el medio llegue a las células más interiores de la esfera. Este efecto, podría afectar sin embargo, a la estabilidad arquitectural de la esfera, dado que las microvellosidades no están entrelazadas. Serán necesarios más estudios para averiguar si hay una combinación de zonas con microvellosidades y zonas con menos espacio intercelular y presencia de matriz extracelular que ayude al mantenimiento de la esfera. A nivel celular, la alteración más relevante es la aparición de mitocondrias más redondeadas y con la arquitectura de las crestas alterada. Este hecho ha sido descrito previamente en líneas establecidas de células tumorales, y esta relacionado con el metabolismo de la glucosa^{91,92}. Así pues, en general no observamos cambios relevantes a nivel morfológico, a lo largo de los pases en cultivos, en ninguna de las 3 líneas estudiadas, salvo aquellos relacionados con la adaptación al medio de cultivo, ya descritas previamente.

Cuando analizamos posibles cambios en proliferación, observamos una tendencia a disminuir los tiempos de duplicación a medida que aumentaban los pases en cultivo. Dos de las tres líneas estudiadas, GBM18 y GBM27, aumentaron claramente la proliferación en pases tardíos. Estos datos complementan los resultados publicados por Lee *et al.*, donde observaban que dos líneas de CITs, aisladas a partir de muestras de GBM, mostraban curvas de crecimiento muy similares en pases 3, 20 y 35⁹³. Nosotros demostramos que dicha observación no es extensible a todas las líneas, sino que por el contrario, existe diversidad en el comportamiento de CITs en cultivo en términos de proliferación. La aparición de nuevos clones con menor tiempo de

duplicación en cultivo podría explicar el aumento de proliferación de GBM27 en pases altos. Sin embargo, los cambios observados entre pases tempranos y tardíos de GBM18 son difícilmente achacables a eventos de selección clonal, dada la alta homología observada en los experimentos de morfología celular y CGHs. Es interesante destacar que en pases tardíos también se observó un aumento en la expresión de genes de indiferenciación y disminución general de la expresión de genes de diferenciación. Dicho aumento fue sustancialmente superior en GBM27, seguido de GBM18 y GBM38. Así pues, parece existir relación entre la aparición de un fenotipo más indiferenciado y el aumento en la proliferación en pases tardíos. Serán necesarios más estudios para evaluar los diferentes mecanismos moleculares que conducen a un aumento de proliferación de CITs en cultivo. En cualquier caso, cuando se utilicen CITs derivadas de GBM para llevar a cabo ensayos de proliferación, es importante tener en consideración que pueden aparecer alteraciones importantes en la proliferación entre los diferentes pases dependiendo de la línea o líneas utilizadas como modelos.

La descripción de los primeros cultivos primarios de CITs aisladas a partir de muestras quirúrgicas de gliomas de alto grado mostraban que eran capaces de reproducir el patrón histopatológico observado en los tumores primarios de los cuales se originaron^{64,77}. Más recientemente, se han publicado trabajos que aumentan la complejidad y diversidad de dichas líneas. Así, Günther *et al.*, establecieron 9 líneas de CITs derivadas de muestras quirúrgicas de GBM. Cuando llevó a cabo análisis de expresión génica en las 9 líneas, estas se separaron claramente en dos clusters. Xenotrasplantes con células del clúster 1, daban lugar a tumores diseminados, mientras que cuando se realizaban con líneas agrupadas en el clúster 2, daban lugar a tumores más nodulares. Los perfiles de expresión génica de los dos clusters eran además compatibles con los subtipos de GBM proneural (clúster 1) y mesenquimal (clúster 2) descritos por Phillip *et al.*^{53,85}. En la misma línea de trabajo, Wakimoto *et al.*, realizó un estudio comparativo a nivel de expresión genómica y análisis histopatológico entre 15 líneas de CITs entre los pases 1 y 2, y las muestras quirúrgicas de los tumores originales⁸⁷. Encontró que sus 15 líneas se podían agrupar en dos categorías en base al grado de diseminación *in vivo*. La primera, que denomina subtipo nodular discreto, son líneas que forman una

masa más o menos hemisférica, bien delimitada del parénquima cerebral circulante, sin evidencias de migración celular masiva y confinada al hemisferio ipsilateral. El segundo, que llamó subtipo invasivo, y que se correspondía con el 75% de las líneas estudiadas, presentaba un fenotipo invasivo, sin bordes delimitados, y con tendencia a migrar a lo largo de los haces de mielina hasta alcanzar el hemisferio contralateral. Además, el fenotipo nodular o invasivo de las CITs podía predecirse mediante análisis de MRI pre-operativo correspondientes. Las muestras que estudiamos nosotros, se ajustaban a los dos subtipos encontrados por Wakimoto *et al.* GBM18 y GBM27, procedían de tumores altamente invasivos en los pacientes de origen, mientras GBM38 procedía de un tumor con fenotipo nodular. Los xenotransplantes realizados en pases tempranos, generaron tumores altamente infiltrativos en el caso de GBM18 y GBM27, con células migrando por los haces de mielina a través del cuerpo calloso y comisura inferior hasta alcanzar el hemisferio contralateral, y extendidas a lo largo de las zonas subventriculares de los ventrículos laterales, muy similares a los descritos inicialmente Günther *et al.*, pertenecientes al cluster 1 y al subtipo invasivo observado por Wakimoto *et al.* ^{41,50}. Por el contrario, los xenotrasplantes realizados con GBM38, generaron tumores nodulares, de bordes definidos y sin células migrando fuera de dichos bordes, muy similares a los descritos inicialmente Günther *et al.*, pertenecientes al cluster 2 y al subtipo nodular discreto observado por Wakimoto *et al.*, ^{85,94}. Cuando llevamos a cabo el mismo tipo de experimentos, utilizando pases tardíos, entre 10 y 20, ambos inclusive, encontramos exactamente el mismo tipo de diseminación para las tres líneas analizadas. Estos resultados demuestran que, a nivel histológico, las diferentes líneas representan bien los tumores de origen durante los 20 primeros pases en cultivo, y es un modelo mucho más representativo de GBM humano que las líneas establecidas crecidas en medio con suero, en términos de reproducir el patrón histopatológico observado en los tumores primarios ⁹³.

Las líneas establecidas de gliomas se han utilizado tradicionalmente tanto para estudiar biología básica de gliomas como para estudios preclínicos de agentes terapéuticos. Sin embargo, estudios comparativos entre líneas establecidas, crecidas en presencia de suero, y muestras de tumores primarios, han demostrado la existencia de enormes divergencias a nivel funcional,

transcripcional y genómico, que hacen dudar de su valor como modelos de los tumores primarios^{93,95,96}. Lee *et al.*, evaluaron el perfil genómico de una población policlonal de células aisladas de una muestra tumoral de GBM mediante análisis del polimorfismo de nucleótidos individuales (SNP). Observaron que cuando se crecían en ausencia de suero, el pase 10 y el pase 45 mantenían un genotipo muy parecido, con un número bajo de alteraciones cromosómicas diferentes, al tumor parental, pero no así cuando se crecían en presencia de suero, donde aumentaba considerablemente las pérdidas y ganancias de ADN⁹³.

En este sentido tanto los modelos animales como los modelos basados en CITs de gliomas de alto grado pueden ser considerados una buena alternativa a la hora de diseñar nuevos experimentos. Sin embargo, actualmente desconocemos si las líneas de CITs presentan o pueden adquirir alteraciones funcionales, transcripcionales o genómicas, diferentes de los tumores primarios a lo largo del tiempo en cultivo. En este contexto, Piccirillo *et al.*, demostraron que diferentes regiones de un mismo GBM pueden estar formadas por distintas subpoblaciones de CITs que, aún procediendo de un ancestro común, pueden presentar importantes diferencias a nivel genético y funcional⁹⁷. En principio, nosotros encontramos que GBM18 es una población totalmente homogénea a nivel genómico, lo que descarta que el protocolo de aislamiento o las condiciones de cultivo puedan inducir alteraciones cromosómicas. Sin embargo, observamos poblaciones heterogéneas a nivel genómico en GBM27 y GBM38, lo que podría indicar la presencia de diferentes clones de CITs derivadas de un ancestro común en los tumores primarios. Además observamos que las dos líneas presentan una elevada inestabilidad cromosómica, con ganancias y pérdidas constantes a lo largo de los pases en cultivo. Considerando nuestros resultados, observamos que el trabajo de Piccirillo *et al.*, no menciona el número de pase en donde se han realizado las comparaciones genómicas, así pues, sus resultados podrían deberse a la presencia de inestabilidad cromosómica en las dos líneas establecidas a partir de un mismo tumor, que han derivado en alteraciones cromosómicas diferentes en las dos líneas en los diferentes pases en cultivo. Sin embargo, la posibilidad más plausible es que en un mismo tumor podamos encontrar familias de CITs en diferentes regiones del tumor, que aunque derivan de un mismo clon, han

evolucionado en microambientes diferentes y adquirido nuevas alteraciones genéticas y epigenéticas⁹⁸. Las muestras de tejido recibidas en el laboratorio sólo representan una parte de estas familias de CITs. Posteriormente, sólo un 50% son capaces de dar lugar a un cultivo primario expandible, el cual puede estar formado por una población clonal o policlonal. Una vez en cultivo, las células presentan cierto grado de inestabilidad cromosómica. En el presente trabajo, líneas monoclonales, como GBM18, parecen mantenerse estables a nivel genómico, dentro de los límites de detección del CGH. Sin embargo, cultivos policlonales como GBM27 o GBM38 parecen estar sujetos a frecuentes eventos de inestabilidad cromosómica, afectando específicamente a regiones donde se localizan genes clave en rutas de reparación de ADN y puntos de control de mitosis.

Finalmente, evaluamos posibles diferencias en la respuesta a 23 fármacos. Observamos que a concentraciones en torno a 10 μM , aparecían cambios importantes en el patrón de respuesta a los fármacos ensayados en aproximadamente el 50% de los mismos. Las tres líneas desarrollaron sensibilidad a cisplatino en pases tardíos, pasando de un IC50 de 75-209 μM a 3-7 μM . Observamos el mismo patrón, aunque mucho más suavizado, para otro agente alquilante como es la temozolomida. En este contexto, se ha observado que el aumento de los niveles de expresión de *OCT3/4* induce un aumento de miR-17/10b y Noxa, aumentando la sensibilidad a cisplatino⁹⁹. En las 3 líneas estudiadas *OCT3/4* aumenta significativamente con el tiempo en cultivo, y podría ser una de las causas que justifique el aumento de sensibilidad a dicho fármaco. En cualquier caso, las diferencias tan significativas observadas a 10 μM sólo se confirmaron a 0,1 μM en el caso de la sensibilidad a taxol en pases altos para GBM18, la sensibilidad a bleomicina, NSC74859 y tipifarnib en el caso de GBM27 y la sensibilidad a tipifarnib y resistencia a velcade en el caso de GBM38. Aunque los mecanismos de resistencia y sensibilidad a esta colección de fármacos está todavía por determinar, es un hecho que las líneas de CITs aisladas de muestras de GBM, pueden cambiar su respuesta a fármacos en solo 20 pases en cultivo. Estos resultados, demuestran que dichas líneas es un buen modelo *in vitro* para evaluar los cambios de respuesta a fármacos (adquisición de sensibilidad o respuesta). Sin

embargo, se necesitarán muchos más estudios que permitan definir la ventana temporal en la que dichas líneas puedan ser utilizadas como avatares para llevar a cabo una búsqueda de fármacos que puedan ser utilizados frente a los tumores primarios de los pacientes de origen.

La utilización de CITs, derivadas de muestras quirúrgicas de gliomas de alto grado, es posiblemente el modelo *in vitro* que mejor representa a los tumores primarios. Sin embargo, dicho modelo, aunque tiene importantes ventajas, todavía presenta muchas limitaciones. Serán necesarios muchos estudios para ampliar el conocimiento sobre la biología y diversidad de la CITs, su papel en el origen y mantenimiento del tumor así como su capacidad para inducir la aparición de recidivas después del tratamiento. Dichos estudios conducirán en un futuro a disponer de modelos personalizados, cada vez más parecidos a los tumores primarios, que permitirán contestar preguntas clave en el manejo clínico de los pacientes.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos se pueden sintetizar en las siguientes conclusiones:

1. La heterogeneidad de los cultivos primarios de CITs aisladas de muestras quirúrgicas humanas es dependiente de cada paciente.
2. Los cultivos primarios de CITs aisladas de muestras quirúrgicas humanas presentan una morfología estable durante, al menos, los primeros 20 pases en cultivo.
3. Los cultivos primarios de CITs aisladas de muestras quirúrgicas humanas adquieren un estado más indiferenciado (en base a la expresión de marcadores de indiferenciación) durante, al menos, los primeros 20 pases en cultivo.
4. Los cultivos primarios de CITs aisladas de muestras quirúrgicas humanas presentan una importante inestabilidad cromosómica, con ganancias y pérdidas de secuencias de ADN genómico, aún cuando se crecen en medio libre de suero. Esta inestabilidad es además dependiente de cada paciente.
5. Los cultivos primarios de CITs aisladas de muestras quirúrgicas humanas disminuyen sus tiempos de duplicación con el tiempo en cultivo. Por lo que es importante acotar el número de pases de trabajo cuando se diseñen experimentos relacionados con proliferación celular.
6. El modelo de glioma humano basado en CITs aisladas de muestras quirúrgicas humanas permite reproducir la histopatología de los tumores primarios durante, al menos, los 20 primeros pases en cultivo, cuando se trasplantan en cerebro de ratón. Así pues es un buen modelo de glioma

humano *in vitro* para el desarrollo de experimentos relacionados con migración y diseminación *in vivo*.

7. Los cultivos primarios de CITs aisladas de muestras quirúrgicas humanas presentan alteraciones importantes en la respuesta a fármacos a lo largo de los pases en cultivo. Por lo que es importante acotar el número de pases de trabajo cuando se diseñen experimentos relacionados con respuesta a fármacos. Es, por tanto, un buen modelo para estudiar los cambios en la sensibilidad o resistencia a determinados fármacos. Pero serán necesarios más estudios comparativos entre CITs en pases bajos y tejido fresco de glioma humano para determinar la utilidad de las CITs como avatares de los tumores primarios para estudiar el perfil de respuesta a fármacos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kleihues P, Cavenee W. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of the nervous system. IARC: Lyon, 2000.
2. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, *et al.* The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol (Berl)* 2007;114:97-109.
3. Fritz A, Percy C, Jack A, Shanmugaratnam K, Sobin L, Perkin DM, Whelan S (eds). International Classification of Diseases for Oncology, Third edition. Geneva: World Health Organization; 2000.
4. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW (eds) (1993) Histological typing of tumours of the central nervous system. World Health Organization international histological classification of tumours. Springer, Heidelberg.
5. H W. The American Physical Society. *Science* 1899; 10:660.
6. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., ... & Bray, F. (2014). GLOBOCAN 2012 v1. 0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013.
7. Crocetti, E., Trama, A., Stiller, C., Caldarella, A., Soffiatti, R., Jaal, J., ... & Brandes, A.. Epidemiology of glial and non-glial brain tumours in Europe. *European Journal of cancer* 2012; 48(10), 1532-1542.
8. Altekruse S, Kosary C, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, Ruhl J, Howlander N, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner M, Lewis D, Cronin K, Chen H, Feuer E, Stinchcomb D, Edwards B (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/, based on November 2009 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2010.
9. Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians* 2011; 61(2), 69-90.
10. Lee, C. H., Jung, K. W., Yoo, H., Park, S., & Lee, S. H. Epidemiology of primary brain and central nervous system tumors in Korea. *Journal of Korean Neurosurgical Society* 2010; 48(2), 145-152.
11. Fuentes-Raspall, R., Vilardell, L., Perez-Bueno, F., Joly, C., Garcia-Gil, M., Garcia-Velasco, A., & Marcos-Gragera, R. Population-based incidence and survival of central nervous system (CNS) malignancies in Girona (Spain) 1994–2005. *Journal of neuro-oncology* 2011; 101(1), 117-123
12. Kanu, O. O., Hughes, B., Di, C., Lin, N., Fu, J., Bigner, D. D., ... & Adamson, C. Glioblastoma multiforme oncogenomics and signaling pathways. *Clinical medicine. Oncology* 2009; 3, 39.

13. Tseng, J. H., Merchant, E., & Tseng, M. Y. Effects of socioeconomic and geographic variations on survival for adult glioma in England and Wales. *Surgical neurology* 2006; 66(3), 258-263.
14. Pichlmeier, U., Bink, A., Schackert, G., & Stummer, W. (2008). Resection and survival in glioblastoma multiforme: an RTOG recursive partitioning analysis of ALA study patients. *Neuro-oncology* 2008; 10(6), 1025-1034.
15. Mirimanoff, R. O., Gorlia, T., Mason, W., Van den Bent, M. J., Kortmann, R. D., Fisher, B., ... & Stupp, R. (2006). Radiotherapy and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: recursive partitioning analysis of the EORTC 26981/22981-NCIC CE3 phase III randomized trial. *Journal of Clinical Oncology* 2006; 24(16), 2563-2569.
16. Bondy, M. L., & Wrensch, M. R. Epidemiology of primary malignant brain tumours. *Bailliere's clinical neurology* 1996; 5(2), 251-270.
17. Ostrom, Q. T., & Barnholtz-Sloan, J. S. Current state of our knowledge on brain tumor epidemiology. *Current neurology and neuroscience reports* 2011; 11(3), 329-335.
18. Ohgaki H. Epidemiology of brain tumors. In: Verma M, (ed), *Methods of Molecular Biology, Cancer Epidemiology*, vol. 472. New Jersey: Humana Press; 2009.
19. Fisher, J. L., Schwartzbaum, J. A., Wrensch, M., & Wiemels, J. L. Epidemiology of brain tumors. *Neurologic clinics* 2007; 25(4), 867-890.
20. Schwartzbaum, J. A., Fisher, J. L., Aldape, K. D., & Wrensch, M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nature Clinical Practice Neurology* 2006; 2(9), 494-503.
21. Ohgaki, H., & Kleihues, P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta neuropathologica* 2005; 109(1), 93-108.
22. Wrensch, M., Minn, Y., Chew, T., Bondy, M., & Berger, M. S. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro-oncology*, 2002; 4(4), 278-299.
23. Kundi, M. Mobile phone use and brain cancer: is the association biased?. *Neuroepidemiology*, 2010; 35(2), 115-116.
24. National Radiological Protection Board (NRPB). Health effects from radiofrequency electromagnetic fields. Report of an independent advisory group on non-ionising radiation. 2003; 14(2):5-177.
25. Shete, S., Hosking, F. J., Robertson, L. B., Dobbins, S. E., Sanson, M., Malmer, B., ... & Houlston, R. S. Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma. *Nature genetics*, 2009; 41(8), 899-904.
26. Ahlbom, A., Feychting, M., Green, A., Kheifets, L., Savitz, D. A., Swerdlow, A. J., & ICNIRP (International Commission for Non-Ionizing Radiation Protection) Standing Committee on Epidemiology. Epidemiologic evidence on mobile phones and tumor risk: a review. *Epidemiology* 2009; 20(5), 639-652.
27. Linos, E., Raine, T., Alonso, A., & Michaud, D. Atopy and risk of brain tumors: a meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute* 2007; 99(20), 1544-1550.

28. Carrozzi, L., & Viegi, G. Allergy and cancer: a biological and epidemiological rebus. *Allergy* 2005; 60(9), 1095-1097.
29. Rollison, D. E., Helzlsouer, K. J., Alberg, A. J., Hoffman, S., Hou, J., Daniel, R., ... & Major, E. O. Serum antibodies to JC virus, BK virus, simian virus 40, and the risk of incident adult astrocytic brain tumors. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2003; 12(5), 460-463.
30. Vasilyeva, I., Shamaev, M., Glavatskiy, A., Chopick, N., Olexenko, N., Tsyubko, O., ... & Malisheva, T. Detection of polyomavirus DNA in human brain tumors. *Exp Oncol* 2004; 26, 78-80.
31. London, W. T., Houff, S. A., Madden, D. L., Fuccillo, D. A., Gravel, M., Wallen, W. C., ... & Ohashi, T. (1978). Brain tumors in owl monkeys inoculated with a human polyomavirus (JC virus). *Science* 1978; 201(4362), 1246-1249.
32. White, M. K., Gordon, J., Reiss, K., Del Valle, L., Croul, S., Giordano, A., ... & Khalili, K. Human polyomaviruses and brain tumors. *Brain Research Reviews* 2005; 50(1), 69-85.
33. Miller, N. R., McKeever, P. E., London, W., Padgett, B. L., Walker, D. L., & Wallen, W. C. Brain tumors of owl monkeys inoculated with JC virus contain the JC virus genome. *Journal of virology*, 1984; 49(3), 848-856.
34. Naumova, E. N. Mystery of seasonality: getting the rhythm of nature. *Journal of public health policy* 2006; 27(1), 2-12.
35. Dolecek, T. A., Propp, J. M., Stroup, N. E., & Kruchko, C. (2012). CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005–2009. *Neuro-oncology* 2012; 14(suppl 5), v1-v49.
36. Spiegel BM, Esrailian E, Laine L, Chamberlain MC. Clinical impact of adjuvant chemotherapy in GBM multiforme : a meta-analysis. *CNS Drugs* 2007; 21: 775-787
37. Westphal M, Hilt DC, Bortey E *et al.* A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro Oncol* 2003; 5: 79-88
38. Perry J, Chambers A, Spithoff K, Laperriere N. Gliadel wafers in the treatment of malignant glioma: a systematic review. *Curr Oncol* 2007; 14: 189-194.
39. Walker MD, Alexander E, Jr., Hunt WE *et al.* Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *J Neurosurg* 1978; 49: 333-343.
40. Kristiansen K, Hagen S, Kollevold T *et al.* (1981) Combined modality therapy of operated astrocytomas grade III and IV. Confirmation of the value of postoperative irradiation and lack of potentiation of bleomycin on survival time: a prospective multicenter trial of the Scandinavian Glioblastoma Study Group. *Cancer* 47: 649-652.
41. Laperriere N, Zuraw L, Cairncross G. (2002) Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiother Oncol* 64: 259-273.

42. Roa W, Brasher PM, Bauman G *et al.* Abbreviated course of radiation therapy in older patients with GBM multiforme: a prospective randomized clinical trial. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1583-1588.
43. Keime-Guibert F, Chinot O, Taillandier L *et al.* Radiotherapy for GBM in the elderly. *N Engl J Med* 2007; 356: 1527-1533.
44. Balana C, Capellades J, Teixidor P *et al.* Clinical course of high-grade glioma patients with a "biopsy-only" surgical approach: a need for individualised treatment. *Clin Transl Oncol* 2007; 9: 797-803.
45. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for GBM. *N Engl J Med* 2005; 352: 987-996.
46. Athanassiou H, Synodinou M, Maragoudakis E *et al.* Randomized phase II study of temozolomide and radiotherapy compared with radiotherapy alone in newly diagnosed GBM multiforme. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2372-2377.
47. Chinot O *et al.* Bevacizumab plus Radiotherapy–Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma. *NEJM* 2014; 370: 709- 722
48. Gilbert MR *et al.* A Randomized Trial of Bevacizumab for Newly Diagnosed Glioblastoma. *NEJM* 2014; 370: 699-708
49. Perez-Garcia A, Carrion-Navarro J, Bosch-Forteza M, Lazaro-Ibanez E, Prat-Acin R, Ayuso-Sacido A. Genomic instability of surgical sample and cancer-initiating cell lines from human glioblastoma. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2012;17:1469-79
50. Suva ML, Rheinbay E, Gillespie SM, *et al.* Reconstructing and reprogramming the tumor-propagating potential of glioblastoma stem-like cells. *Cell* 2014; 157:580-94.
51. Sathornsumetee S, Rich JN. Designer therapies for glioblastoma multiforme. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1142:108-32.
52. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 2008;455:1061-8.
53. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, *et al.* Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 2006;9:157-73.
54. Freije WA, Castro-Vargas FE, Fang Z, *et al.* Gene expression profiling of gliomas strongly predicts survival. *Cancer Res* 2004;64:6503-10.
55. Godard S, Getz G, Delorenzi M, *et al.* Classification of human astrocytic gliomas on the basis of gene expression: a correlated group of genes with angiogenic activity emerges as a strong predictor of subtypes. *Cancer Res* 2003; 63:6613-25.
56. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, *et al.* Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 2010;17:98-110.
57. Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, *et al.* Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell* 2010; 17:510-22.

58. Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, *et al.* The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 2013;155:462-77.
59. Romaguera-Ros M, Peris-Celda M, Oliver-De La Cruz J, *et al.* Cancer-initiating enriched cell lines from human glioblastoma: preparing for drug discovery assays. *Stem Cell Rev* 2013;8:288-98.
60. Singh I, Paintlia AS, Khan M, *et al.* Impaired peroxisomal function in the central nervous system with inflammatory disease of experimental autoimmune encephalomyelitis animals and protection by lovastatin treatment. *Brain Res* 2004;1022:1-11.
61. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, *et al.* Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003; 63:5821-8.
62. Greenfield JP, Ayuso-Sacido A, Schwartz TH, *et al.* Use of human neural tissue for the generation of progenitors. *Neurosurgery* 2008; 62:21-37; discussion 27-30.
63. Shapiro JR, Shapiro WR. Clonal tumor cell heterogeneity. *Prog Exp Tumor Res* 1984; 27:49-66.
64. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, *et al.* Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004; 432:396-401
65. Beier CP, Beier D. CD 133 negative cancer stem cells in glioblastoma. *Front Biosci (Elite Ed)* 2011;3:701-10
66. Bao S, Wu Q, Li Z, *et al.* Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth. *cancer Res* 2008; 68:6043-8
67. Son MJ, Woolard K, Nam DH, Lee J, Fine HA. SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma. *Cell Stem Cell* 2009; 4:440-52.
68. Anido J, Saez-Borderias A, Gonzalez-Junca A, *et al.* TGF-beta Receptor Inhibitors Target the CD44(high)/Id1(high) Glioma-Initiating Cell Population in Human Glioblastoma. *Cancer Cell* 2014; 18:655-68.
69. Mazzoleni S, Politi LS, Pala M, *et al.* Epidermal growth factor receptor expression identifies functionally and molecularly distinct tumor-initiating cells in human glioblastoma multiforme and is required for gliomagenesis. *Cancer Res* 2013; 70:7500-13.
70. Ogden AT, Waziri AE, Lochhead RA, *et al.* Identification of A2B5+CD133- tumor-initiating cells in adult human gliomas. *Neurosurgery* 2008; 62:505-14; discussion 14-5.
71. Beier F, Beier CP, Aschenbrenner I, Hildebrandt GC, Brummendorf TH, Beier D. Identification of CD133(-)/telomerase(low) progenitor cells in glioblastoma-derived cancer stem cell lines. *Cell Mol Neurobiol* 2011; 31:337-43.
72. Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 2002; 22:629-34.
73. Cambier S, Benard G, Mesmer-Dudons N, *et al.* At environmental doses, dietary methylmercury inhibits mitochondrial energy metabolism in skeletal muscles of the zebra fish (*Danio rerio*). *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41:791-9.

74. Nunes MC, Roy NS, Keyoung HM, *et al.* Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain. *Nat Med* 2003; 9:439-47.
75. Imasawa T, Rossignol R. Podocyte energy metabolism and glomerular diseases. *Int J Biochem Cell Biol* 2013; 45:2109-18.
76. Benard G, Massa F, Puente N, *et al.* Mitochondrial CB(1) receptors regulate neuronal energy metabolism. *Nat Neurosci* 2012; 15:558-64.
77. Galli R, Binda E, Orfanelli U, *et al.* Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* 2004; 64:7011-21.
78. Ayuso-Sacido A, Roy NS, Schwartz TH, Greenfield JP, Boockvar JA. Long-term expansion of adult human brain subventricular zone precursors. *Neurosurgery* 2008; 62:223-9; discussion 9-31.
79. Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, *et al.* Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* 2010; 468:824-8.
80. Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, *et al.* Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature* 2010; 468:829-33.
81. Klink B, Schlingelhof B, Klink M, Stout-Weider K, Patt S, Schrock E. Glioblastomas with oligodendroglial component - common origin of the different histological parts and genetic subclassification. *Anal Cell Pathol (Amst)* 2010; 33:37-54.
82. Achanta P, Sedora Roman NI, Quinones-Hinojosa A. Gliomagenesis and the use of neural stem cells in brain tumor treatment. *Anticancer Agents Med Chem* 2010; 10:121-30.
83. Jiang Y, Uhrbom L. On the origin of glioma. *Upsala journal of medical sciences* 2012; 117:113-21.
84. Romaguera-Ros M, Peris-Celda M, Oliver-De La Cruz J, *et al.* Cancer-initiating enriched cell lines from human glioblastoma: preparing for drug discovery assays. *Stem Cell Rev* 2012; 8:288-98.
85. Gunther HS, Schmidt NO, Phillips HS, *et al.* Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria. *Oncogene* 2008; 27:2897-909.
86. Lottaz C, Beier D, Meyer K, *et al.* Transcriptional profiles of CD133+ and CD133- glioblastoma-derived cancer stem cell lines suggest different cells of origin. *Cancer Res* 2010 ;70:2030-40.
87. Wakimoto H, Mohapatra G, Kanai R, *et al.* Maintenance of primary tumor phenotype and genotype in glioblastoma stem cells. *Neuro Oncol* 2012;14:132-44.
88. Stoczynska-Fidelus E, Och W, Rieske P, *et al.* Spontaneous in vitro senescence of glioma cells confirmed by an antibody against IDH1R132H. *Anticancer Res* 2014;34:2859-67.

89. Stoczynska-Fidelus E, Piaskowski S, Bienkowski M, *et al.* The failure in the stabilization of glioblastoma-derived cell lines: spontaneous in vitro senescence as the main culprit. *PLoS One* 2014;9:e87136.
90. Roy NS, Wang S, Harrison-Restelli C, *et al.* Identification, isolation, and promoter-defined separation of mitotic oligodendrocyte progenitor cells from the adult human subcortical white matter. *J Neurosci* 1999; 19:9986-95.
91. Benard G, Faustin B, Galinier A, *et al.* Functional dynamic compartmentalization of respiratory chain intermediate substrates: implications for the control of energy production and mitochondrial diseases. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40:1543-54.
92. Rossignol R, Gilkerson R, Aggeler R, Yamagata K, Remington SJ, Capaldi RA. Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64:985-93.
93. Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, *et al.* Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* 2006; 9:391-403.
94. Wakimoto H, Kesari S, Farrell CJ, *et al.* Human glioblastoma-derived cancer stem cells: establishment of invasive glioma models and treatment with oncolytic herpes simplex virus vectors. *Cancer Res* 2009; 69:3472-81.
95. Li A, Walling J, Kotliarov Y, *et al.* Genomic changes and gene expression profiles reveal that established glioma cell lines are poorly representative of primary human gliomas. *Mol Cancer Res* 2008; 6:21-30.
96. Inagaki A, Soeda A, Oka N, *et al.* Long-term maintenance of brain tumor stem cell properties under at non-adherent and adherent culture conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 361:586-92.
97. Piccirillo SG, Combi R, Cajola L, *et al.* Distinct pools of cancer stem-like cells coexist within human glioblastomas and display different tumorigenicity and independent genomic evolution. *Oncogene* 2009; 28:1807-11.
98. Perez-Garcia A, Carrion-Navarro J, Bosch-Forteza M, Lazaro-Ibanez E, Prat-Acin R, Ayuso-Sacido A. Genomic instability of surgical sample and cancer-initiating cell lines from human glioblastoma. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2012; 17:1469-79.
99. Koster R, van Vugt MA, Timmer-Bosscha H, Gietema JA, de Jong S. Unravelling mechanisms of cisplatin sensitivity and resistance in testicular cancer. *Expert Rev Mol Med* 2013; 15:e12.

ANEXO