



TÉCNICAS DE IMAGEN EN INVESTIGACIÓN PRECLÍNICA:
APLICABILIDAD EN ESTUDIOS DE PROGRESION DE TUMORES
PRIMARIOS INTRACRANEALES EN MODELOS ANIMALES

Proyecto individual

AUTOR: JOSÉ ANTONIO MARTINEZ MONTERO

Grupo 2

TUTOR: EDUARDO ROMERO SANZ

Curso 2020-21



Contenido

Resumen.....	2
Summary.....	3
Introducción.....	4
Objetivos	11
Material y métodos.....	12
Resultados.....	17
Discusión.....	21
Conclusiones	23
Bibliografía.....	25

Resumen

El cáncer es una de las principales causas de muerte. Entre los distintos tipos, los tumores derivados de las células gliales: astrocitomas y glioblastoma multiforme (GBM), representan aproximadamente el 38% de los tumores cerebrales primarios, neoplasias de causa desconocida que raramente producen metástasis. El GBM constituye el tipo más agresivo e incurable. A pesar del desarrollo de tratamientos como la quimioterapia, la radioterapia y la neurocirugía, estos tumores tienden a reproducirse de nuevo, produciendo una alta tasa de mortalidad. Con el objetivo de descubrir nuevos tratamientos para esta enfermedad mortal y evitar recidivas, se realizan estudios preclínicos en modelos animales de esta enfermedad tumoral. Entre las diversas metodologías disponibles, se utiliza el trasplante intracerebral de líneas tumorales, como la línea tumoral CT-2A en ratones. En este trabajo describo uno de estos estudios realizado en un modelo animal murino: ratón cepa C57BL/6 en el que una o dos semanas tras el trasplante intracerebral de células CT-2A se origina un tumor muy agresivo, del tipo del GBM humano. La línea tumoral CT-2A procede de ratones de la cepa C57BL/6 a los que se les inyectó meses antes en el cerebro un agente carcinógeno derivado del "metilcolantreno". Este modelo tiene un patrón de crecimiento predecible y reproducible. En el presente trabajo describo como se usa este modelo para el desarrollo experimental de una terapia mediante hipertermia óptica utilizando irradiación laser sobre nanopartículas de oro.

Summary

Cancer is one of the leading causes of death worldwide. Among different types, tumors derived from glial cells: astrocytomas and glioblastoma, represent approximately 38% of primary brain tumors, neoplasms of unknown cause originated in cells of the brain itself that rarely metastasize. Glioblastoma multiforme (GBM) is the most aggressive type, incurable, that usually kills the patient in a short period time of evolution, even 2-6 months. At present, despite the development of treatments such as chemotherapy, radiotherapy and neurosurgery, these tumors tend to reproduce again, producing a high mortality rate. Consequently, research centers carry out preclinical studies in experimental animals models of brain cancer disease with the aim of discovering new procedures to obtain an effective treatment and prevent relapses. Among the various types of methodologies to build up animal models of brain tumors in experimental animals, we present a disease model in syngeneic C57BL/6 mouse. A very aggressive brain tumor similar to the human GBM can be obtained following intracerebral transplantation of tumor cells of the type CT-2A, a tumor cell line isolated from the brain of C57BL/6 mouse strain after intracerebral administration of a carcinogen derived from the carcinogen methylcholanthrene. In the present work, we describe how can we used this tumor model for the development of an optic hyperthermia therapy by laser irradiation of gold nanoparticles.

Introducción

La neurooncología experimental exige la creación de modelos animales apropiados para evaluar la eficacia de enfoques innovadores para el tratamiento de tumores cerebrales humanos primarios⁽¹⁻⁶⁾. Estos modelos de laboratorio se utilizan para el cribado de fármacos en ensayos preclínicos o bien estudiar la biología básica de los tumores, posibilitando la traslación de avances científicos para la comprensión de los mecanismos de inicio y progresión del cáncer y así instaurar terapias adecuadas.

Es necesario comprender las características específicas celulares y moleculares de cánceres humanos específicos para acelerar tanto nuestro conocimiento sobre la patogénesis molecular del cáncer como para el descubrimiento de dianas terapéuticas apropiadas⁽⁷⁻¹⁰⁾. Los avances recientes en biología molecular nos han llevado a la identificación de algunas causas moleculares y genéticas de los tumores cerebrales⁽¹¹⁻¹⁵⁾. Aunque los modelos disponibles, ya sea a nivel celular, tisular o animal, no representan exactamente la biología de los tumores cerebrales humanos, los modelos animales pueden ofrecer información significativa sobre estos tumores, proporcionando así una mejor comprensión de los mecanismos biológicos subyacentes a la generación de tumores: crecimiento, angiogénesis, invasión y metástasis^(16,17). El modelado *in vivo* nos proporciona interacciones esenciales entre el tumor y el huésped y es un medio más preciso para modelar el cáncer humano^(18,19).

A medida que avanza el conocimiento de la biología molecular de las neoplasias, la tecnología transgénica se ha utilizado para dilucidar los complejos mecanismos moleculares que subyacen a la oncogénesis y la progresión de los tumores cerebrales. De hecho, el análisis de secuenciación del GBM humano muestra que las heterogeneidades y mutaciones múltiples pueden ser la clave de la resistencia a los medicamentos⁽²⁰⁾. Existen diversos modelos animales experimentales para investigar sobre tumores cerebrales usando ratones modificados genéticamente, por ejemplo con genes sobre-expresados y/o delecionados^(6,20-23). Sin embargo, dado que no existen mecanismos adecuados para correlacionar las alteraciones genéticas en los tumores de ratón con sus correspondientes humanos, hasta qué punto los modelos existentes basados en la tecnología transgénica en roedores imitan la biología del cáncer de

cerebro primario en humanos sigue siendo incierto y debe aclararse. Los perfiles de expresión génica, los elementos de control de la proliferación, las vías y la célula de origen de los tumores cerebrales siguen siendo en gran parte desconocidos y los elementos moleculares, como los promotores y potenciadores específicos de tejido para crear modelos genéticamente precisos de tumores cerebrales, aún no los conocemos bien. También existen modelos ortotópicos estandarizados de tumores cerebrales inoculados en ratones que imitan estrechamente la situación clínica humana en términos de características histopatológicas y angiogénicas. Estos modelos están basados en trasplantes de células de glioma de ratón y rata derivados de células tumorales cultivadas extraídas de estos animales⁽²⁴⁻²⁹⁾. Cabe señalar que la alternativa de implante de líneas celulares de glioma humano establecidas en ratones desprovistos de inmunidad experimentan con el tiempo numerosos cambios morfológicos y genéticos y no reproducen la biología del tumor humano original ni las características del huésped por la ausencia de inmunidad. Por tanto, los modelos animales de implante de células cancerosas humanas no reflejan con precisión la interacción entre el tumor y el huésped que se produce naturalmente en los pacientes. Por último, los modelos de tumores cerebrales *in vivo* inducidos químicamente nos podrían proporcionar pistas sobre el estudio del efecto de carcinógenos en el desarrollo de ciertos tipos de neoplasias cerebrales. Los modelos animales de tumores cerebrales primarios generados en las dos últimas décadas han proporcionado avances importantes en nuestra comprensión de los mecanismos celulares y moleculares implicados en la generación, progresión de las neoplasias cerebrales. No obstante, la utilidad de combinar los diferentes modelos animales de tumores en estudios preclínicos es muy útil pero requiere de métodos para validar, comparar y contrastar el modelo animal con su correspondiente tipo humano. Resumiendo, en la actualidad distinguimos dos agrupaciones metodológicas para la generación de modelos animales: i) generación de modelos animales de tumores cerebrales obtenidos mediante manipulación genética, ii) tumores inducidos químicamente en roedores mediante implante de carcinógenos, y iii) mediante trasplante de células tumorales humanas en el cerebro de ratones inmunodeprimidos (*nude*), o trasplante de células tumorales obtenidas del cerebro de roedores (rata o ratón) tras implante de carcinógeno (punto ii) que, una vez seleccionadas y mantenidas mediante procedimientos *in vitro* de cultivos celulares para permitir su proliferación,

son trasplantadas en la misma especie animal que las han originado: modelo "singeneico", las células tumorales y las del huésped mantienen genes idénticos, y además el huésped conserva sus capacidades inmunológicas activas. A este último tipo me voy a referir en este trabajo, particularmente a experimentos que utilizan la línea tumoral CT-2A^(30,31). La línea tumoral CT-2A, línea bien caracterizada que tras su trasplante en el sistema nervioso central de ratones de la cepa C57BL6/J origina un tipo de tumor glial muy agresivo de características histológicas y de progresión muy similar al comportamiento del glioblastoma multiforme humano (GBM)^(27,32).

Una de las características a tener en cuenta en el desarrollo del GBM es su capacidad de proliferación e infiltración en el parénquima cerebral, lo que le confiere especial capacidad para matar al paciente. Una de las capacidades que se valoran en los estudios experimentales preclínicos para el tratamiento farmacológico de los tumores cerebrales es determinar su capacidad de controlar su expansión intracerebral, no solo por las consecuencias derivadas de la hipertensión intracraneal que ello genera, sino también por la destrucción de vías nerviosas de comunicación que comporta deterioro en capacidades motoras, sensoriales y de comportamiento. Para este análisis de progresión es fundamental que usemos técnicas de imagen no invasivas que permitan determinaciones cuantitativas del volumen del tumor utilizando técnicas de diagnóstico por imagen cerebral. La sensibilidad de estos procedimientos como criterio objetivo de respuesta a la terapia es muy importante. Entre estas técnicas de imagen destacan en los estudios *in vivo* las siguientes:

- 1.** El PET (Tomografía por Emisión de Positrones, Figura 1), es una técnica diagnóstica de imagen de Medicina Nuclear que utiliza radiofármacos que se distribuyen por todo el cuerpo. Proporciona información sobre la dinámica temporal y espacial de diversas alteraciones biológicas específicas, y se puede utilizar en modelos animales de tumores cerebrales para comprender las características del tumor y guiar su tratamiento. En comparación con las imágenes de diagnóstico convencionales, como la tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética (RM), que abordan principalmente las características morfológicas del tumor, las imágenes de PET tienen una mayor sensibilidad con

respecto a la detección del tumor y la monitorización temprana de la respuesta al tratamiento⁽³³⁾.

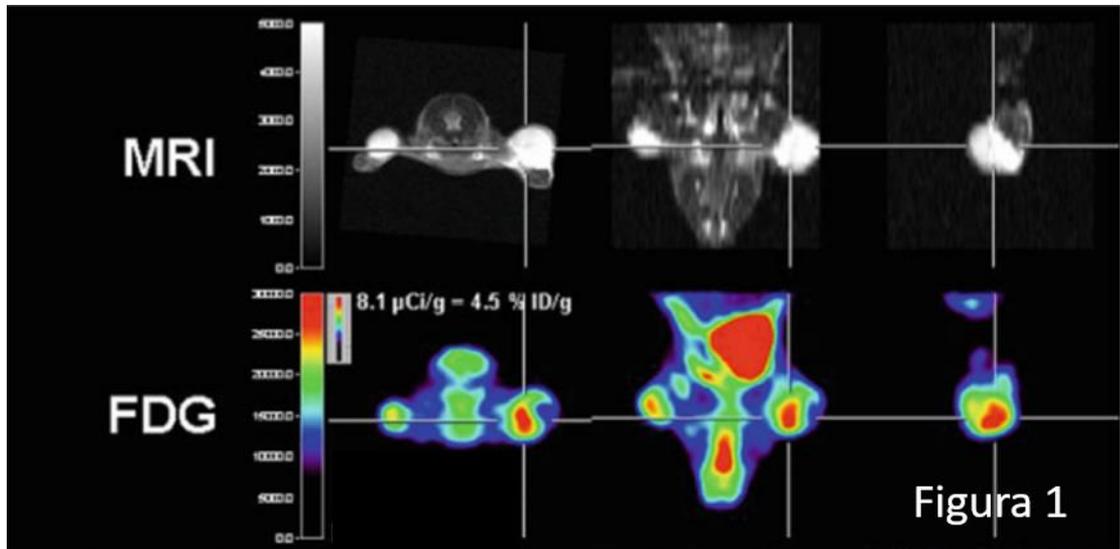


Figura 1.- La imagen molecular con PET se utiliza cada vez más en neurooncología, ya que proporciona información metabólica adicional del tumor. La figura muestra tres gliomas experimentales subcutáneos en ratón. La fila 1 muestra la localización de los tumores por resonancia magnética. En cambio, la fila 2 muestra el tejido diana viable mediante [¹⁸F] FDG (fluoro-D-glucosa)-PET. Tomada de *Animal Models of Brain Tumors*. Waerzeggers et al., Chapter 16⁽³⁴⁾.

2. Tomografía Computerizada por Emisión de fotón único (SPECT, Figura 2a). El SPECT es positivo en aquellos casos que muestran un aumento focal de la captación del trazador dentro del parénquima cerebral. El SPECT es una técnica de imagen tomográfica de medicina nuclear que utiliza rayos gamma que son captados por una gamma cámara. La Imagen en general y la neuroimagen en particular han convertido a esta en una técnica



ampliamente utilizada en Medicina Molecular, y, con el advenimiento de los equipos preclínicos, nos permite realizar estudios en animales de experimentación *in vivo*. La técnica requiere de la administración de un radiisótopo emisor gamma (un radionúclido) al sujeto a estudiar, normalmente mediante la inyección en el torrente sanguíneo. Ocasionalmente, el radioisótopo

es un simple ión soluble en disolución. Sin embargo, en general el radioisótopo suele estar unido a una molécula específica para crear un radioligando, cuyas propiedades permiten su unión a ciertos tipos de tejido. Es una técnica de gran valor diagnóstico, particularmente gracias al uso del glucoheptonato de tecnecio-99m (^{99m}Tc , GHA) ó ^{89}Zr y ^{177}Lu para la clasificación de tumores cerebrales por su grado (Figura 2b).

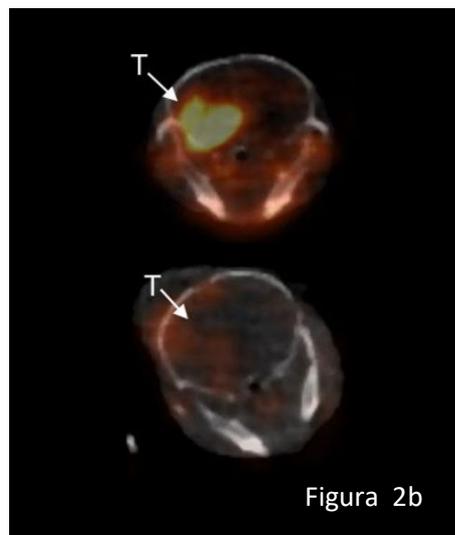


Figura 2b

Figura 2.- Imágenes de SPECT que muestra células inmunitarias positivas para el antígeno CD11b en un modelo de ratón ortotópico de glioma. El anticuerpo está marcado con ^{89}Zr y ^{177}Lu . Tomada de Nigam et al.⁽³⁵⁾

- 3.** Imagen por Resonancia Magnética (RMI, Figura 3). Técnica que permite obtener imágenes del crecimiento del tumor de ratón en días sucesivos. Las imágenes pueden obtenerse en T1 y T2, y además por sus propiedades electromagnéticas, el gadolinio se suele utilizar en la aplicación de esta técnica para mayor realce de los límites del tumor que facilita un mejor cálculo de su volumen en los estudios de su seguimiento^(27,29,36,37). Por este motivo, la técnica RMI es mayormente utilizada en modelos de tumor *in vivo* en estudios preclínicos. Asimismo, no se necesita la exposición de los animales de experimentación a radiaciones, evitándose gestión de la contención, identificación y retirada de los residuos radiactivos y de otros residuos peligrosos, y permite realizar estudios longitudinales sencillos en el mismo animal durante semanas.

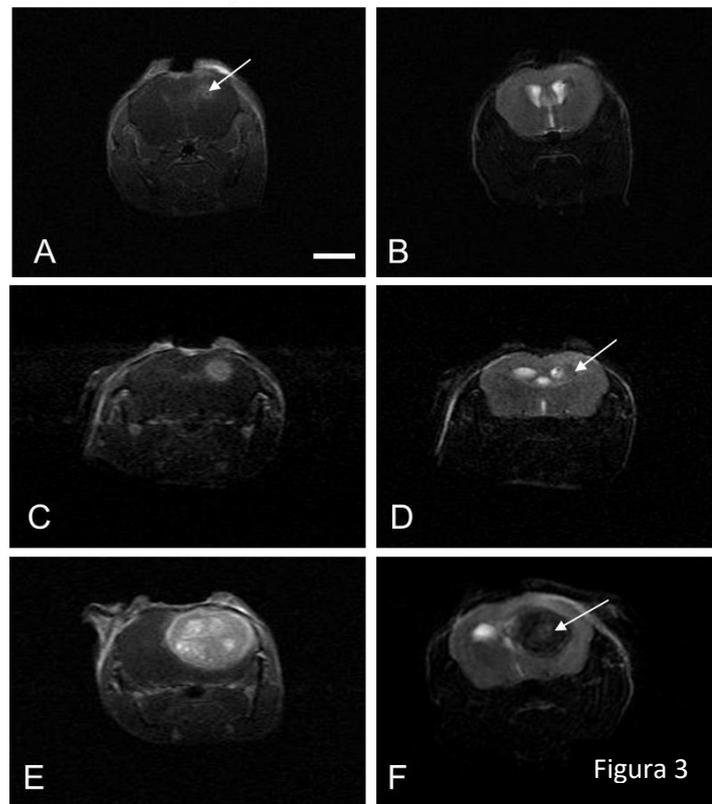


Figura 3.- Imágenes coronales obtenidas con RM y realizadas a diferentes intervalos de tiempo que muestran el crecimiento progresivo de un tumor experimental después de la inyección intracraneal de células de astrocitoma, CT-2A. La evaluación de los cambios en el volumen del tumor se muestra mediante el uso de imágenes ponderadas en T1 (A, C, E) y T2 (B, D, F) potenciadas con gadolinio. A, B, Secciones al mismo nivel una semana después de la inyección intracerebral de células CT-2A. Una pequeña masa tumoral en A (flecha) se localiza profundamente en el caudado. En este momento, la imagen ponderada en T2 (B) es capaz de detectar la masa tumoral que se muestra en A. C, D, Aspecto del tumor dos semanas después de la inyección. En este momento, la masa tumoral (flecha en D) desplaza el ventrículo lateral permitiendo la identificación del tumor por imagen potenciada en T2. E, F, agrandamiento del tumor cuatro semanas después de la inyección. Se observa un borde delgado de realce de contraste alrededor del tumor, así como un realce nodular dentro del tumor (E). Con T2 se ve claramente un efecto de masa que distorsiona los ventrículos lateral y dorsal derecho y una pequeña área hiperintensa realzada (flecha) que probablemente representa un quiste (F). Barra de escala: 5 mm. Imagen tomada de Martínez-Murillo et al. (27).

-Respecto de las posibles incidencias sobre la actividad profesional en la especialidad de Imagen para el Diagnóstico y Medicina Nuclear que justifican el presente estudio, he de significar que en la actualidad las "técnicas de imagen para el diagnóstico y medicina

nuclear” no invasivas se usan cada vez con más frecuencia en los planteamientos de estudios preclínicos experimentales que tienen como finalidad el diseño de nuevos tratamientos/fármacos eficaces para tratar patologías en modelos animales de enfermedades humanas, por las ventajas que ofrecen confirmadas en el ejemplo práctico que describo en este trabajo.

Objetivos

La finalidad de este trabajo es valorar la **aplicabilidad** de las "técnicas de imagen para el diagnóstico" en la realización de estudios preclínicos para el ensayo de nuevas terapias dirigidas a curar o detener la progresión de tumores intracerebrales primarios. En el caso que expongo: tumores primarios del sistema nervioso central derivados de células gliales, específicamente el GBM. El papel del técnico en este tipo de experimentación es crucial, no solo para la puesta en marcha del equipo, igualmente para la toma de medidas volumétricas.

Hipótesis: Los tratamientos actuales del GBM comprenden radioterapia, quimioterapia y cirugía. La nanotecnología puede ayudar a administrar fármacos terapéuticos en el SNC salvando la barrera hematoencefálica, pero además ofrece otras posibilidades que incluyen el tratamiento hipertérmico basado en el uso de nanopartículas de oro (GNRS) e irradiación con láser, procedimiento capaz de inducir la muerte celular *in vitro*⁽³⁸⁾ e *in vivo*⁽²⁹⁾.

Objetivos:

1.- Un **objetivo general** orientado a mostrar los avances científicos obtenidos tras la generación de modelos animales de enfermedad tumoral cerebral primaria, y 2.- Un **objetivo metodológico** que pretende evaluar los resultados de la experimentación científica obtenidos mediante RMI en los referidos modelos animales y la importancia del papel del técnico en este tipo de trabajos. Además, en este trabajo se persigue un **objetivo científico específico** relacionado con el impacto que sobre la evolución del GBM ejerce un tratamiento experimental de hipertermia óptica. El procedimiento metodológico de RMI no presenta limitaciones para este tipo de estudios, que es ampliamente utilizado en clínica humana^(39,40) y estudios preclínicos^(27,41).

La eficacia del tratamiento se evalúa en un modelo de glioma maligno de roedor estudiando: i) la permeabilidad microvascular del tumor, indicador de angiogénesis, y ii) el crecimiento tumoral analizando las modificaciones del volumen de los tumores resultantes tras el tratamiento. Ambos factores se correlacionan con el grado de eficacia del tratamiento tumoral. El modelo experimental que describo ha sido recientemente publicado⁽²⁹⁾.

Material y métodos

1 Cultivo celular: Los experimentadores utilizan células de la línea CT-2A extraídas de un astrocitoma experimental generado en un ratón de la cepa C57BL/6 (Harlan) tras meses después de un implante intracerebral del carcinógeno 20-metilcolantreno⁽³¹⁾. Las células tumorales se cultivan en medio RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen Co., Carlsbad, CA, EE. UU.), complementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10% en una atmósfera humidificada que contiene aire al 95% y CO₂ al 5% a 37 °C. Una vez que las células alcanzan confluencia, el técnico de laboratorio procede a su tripsinización para levantarlas y concentrarlas para trasplante mediante centrifugación a 1000rpm durante 5 minutos. El pellet obtenido se resuspende en medio de cultivo RPMI 1640. La suspensión celular se ajusta para obtener una concentración apropiada de células para inyectar (8×10^4 células en 4 μ l)⁽²⁹⁾.

2 Modelo de tumor de ratón. Cirugía estereotáxica: El experimento lo plantean en ratones de cuatro meses de edad ($35,26 \text{ g} \pm 1,01$ de peso corporal) distribuidos en dos grupos: i) controles PBS (n=6) y ii) tratados por hipertermia óptica: GNRs+laser (n=18). Los animales se les aloja con libre acceso a alimentos y agua en una sala para animales con una temperatura controlada y un ciclo de luz natural. Se inyectan las células de la línea CT-2A en el cerebro (núcleo caudado-putamen derecho, CP) de estos animales experimentales mediante inyección intracraneal con jeringa Hamilton utilizando guía estereotáxica. Para este procedimiento, los ratones se anestesian convenientemente con isoflurano inhalado (Isoflo) inmovilizados en un equipo de estereotaxia para conseguir una perfecta localización del núcleo CP para el implante (equipo: David Kopf Instruments, Tujunga, CA, EE. UU.). Las células tumorales se inyectan en un mínimo volumen de 0,15 μ l durante un período de tiempo de 15 min, esta cantidad es equivalente a aproximadamente 3.000 células totales. Dos semanas después del implante celular, se confirmó una adecuada proliferación celular mediante y resonancia magnética (Figura 4).

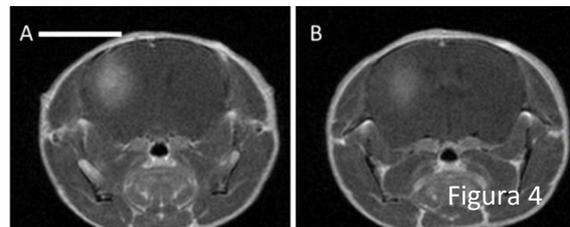


Figura 4. Proliferación celular vista por RMI. Los paneles A, B, representan imágenes ponderadas en T1 (Gadolinio poscontraste) correspondientes al mismo tumor CT-2A en dos secciones próximas que muestran la progresión del tumor a diferentes niveles rostro-caudales dos semanas después del implante celular. En A y B la señal hiperintensa está restringida al CP en el hemisferio derecho. Barras de escala: A, B = 5 mm. Imagen tomada de Casanova-Carvajal et al.⁽²⁹⁾.

Después del trasplante de las células tumorales, se procede a evaluar mediante RM la presencia del tumor generado y su evolución, es decir las modificaciones temporales de su tamaño (volumen), como se muestra en las figuras 4, 8 y 9.

3 Adquisición de imágenes RMI: En este apartado, el papel del técnico en Imagen es crítico. La RMI para este trabajo se realizó por técnicos especializados en el CAI de Resonancia magnética de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), utilizando un escáner de mesa Tesla [Icon (1T-MRI); Bruker BioSpin GmbH, Ettlingen, Alemania] (Figura 5, <https://www.news-medical.net/news/20170222/Routine-small-animal-MR-imaging-using-the-ICON.aspx>), disponible en el Instituto Pluridisciplinar. El sistema



Figura 5



Figura 6

consta de un imán permanente de 1 T (sin necesidad de refrigeración adicional para el imán) con una bobina de gradiente que proporciona una fuerza de gradiente de 450 mT/m. Los sistemas de monitorización de animales previamente anestesiados como he informado en el punto 2

(Figura 6), y la bobina de RF de cabeza de ratón solenoide para el 1T-MRI se integran en la cama/bandeja (Figura 7) y permiten manipular a los animales con un

posicionamiento preciso de la bobina y un control total de la anestesia, frecuencia cardiaca y la temperatura corporal. Quince minutos antes de colocar al ratón en la cama, se le inyectan por vía intraperitoneal 0,4 mmol/kg de gadopentetato de dimeglumina (Gadolinium, Magnevist, Schering, Alemania). Los animales son anestesiados con una mezcla de isofluorano en oxígeno (2% para inducción y 1% para mantenimiento). Con el fin de evaluar el volumen del tumor, el experimento de resonancia magnética consiste en imágenes ponderadas en T1 y T2 de Fast Spin Echo (FSE) pre y post-contraste bidimensionales (T1WI, T2WI). Ambas secuencias son adquiridas con la misma geometría y resolución: campo de visión de 20×20 mm, número de cortes de 15, grosor de corte de 1 mm, tamaño de matriz 160x160 que se reconstruye a 200x200,

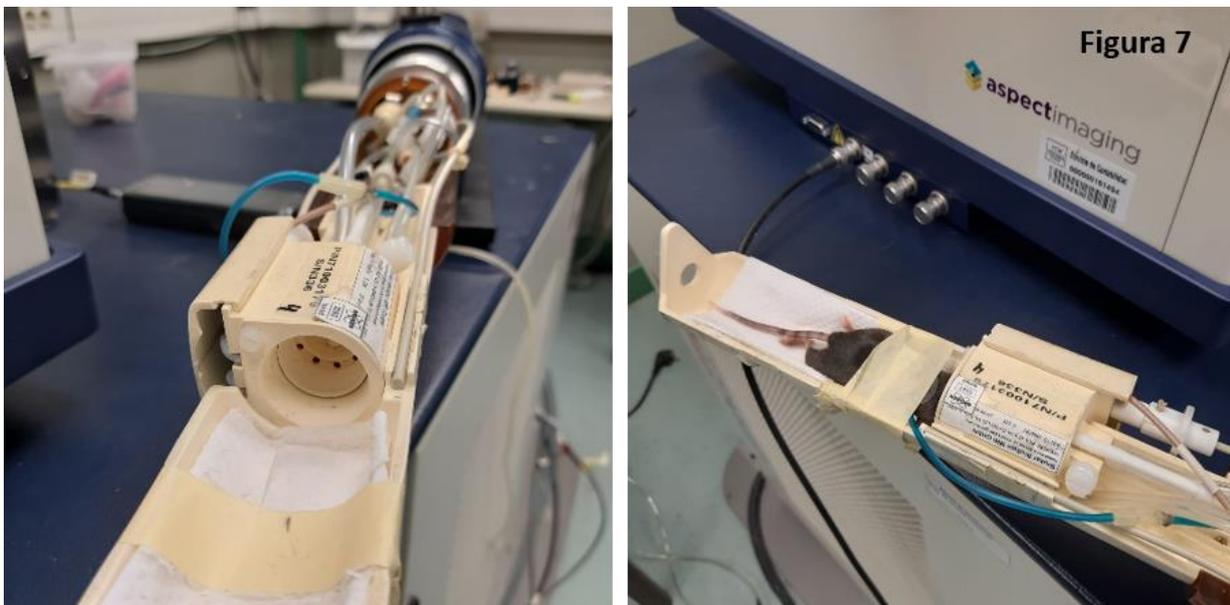


Figura 7, Representa la bandeja (cama) para la sujeción del animal de experimentación con cámara de aislamiento y antena incorporada.

obteniéndose una resolución final de 0.100x0,100 mm. Los parámetros de T2WI son los siguientes: tiempo de repetición/tiempo de eco (TR/TE), 3040/96ms; 12 promedios, longitud del tren de eco, 12; tiempo de adquisición ~ 8 minutos. Los parámetros de T1WI fueron: TR / TE, 262/6 ms; 36 promedios, longitud del tren de eco, 2; tiempo de adquisición ~ 12 minutos. La primera medición se realiza dos semanas después del implante de las células CT-2A. El volumen tumoral se analiza utilizando el software gratuito ImageJ 1.50i. En todos los casos, se miden los volúmenes tumorales tanto absolutos como relativos, normalizados con respecto al volumen cerebral total. Las

imágenes se repiten cada semana después para todos los individuos. En los casos que se muestre una clara tendencia de supervivencia, se llevan a cabo dos estudios de resonancia magnética adicionales semanales, hasta un total de cuatro exploraciones (ver Diagrama 1).

4 Terapia fototérmica: dos semanas después del implante de las células tumorales, los ratones se pesaron y luego se anestesiaron con isoflurano al 1%. Los animales seleccionados se procesaron por el experimentador para terapia fototérmica, utilizando el mismo protocolo quirúrgico que en el apartado **2**. Se inyectaron 2 μ L de GNRs a 4 mm de profundidad, el mismo lugar donde se inyectaron previamente las células tumorales dos semanas antes, a una velocidad de 0,5 μ L / min. Después de 5 minutos, se inyecta una segunda dosis de 2 μ l a 2 mm de profundidad levantando la aguja de manera apropiada. Diez minutos después de la segunda inyección, se retiró la aguja. En resumen, se inyectaron un total de 4 μ L de GNRs. El láser se enfocó a través del mismo orificio de trépano previamente utilizado para inyectar las células tumorales y los GNRs. El proceso de radiación se llevó a cabo durante 25 minutos continuos. El procedimiento se repitió durante tres días consecutivos en 18 ratones denominados grupo tratado (diagrama 1). La temperatura en la zona del tumor se midió con la ayuda del dispositivo: Athermal probe (Luxtron Corporation). Los resultados en animales tratados se comparan con 6 ratones del grupo control, grupo que tras el trasplante de células tumorales no recibe tratamiento alguno.

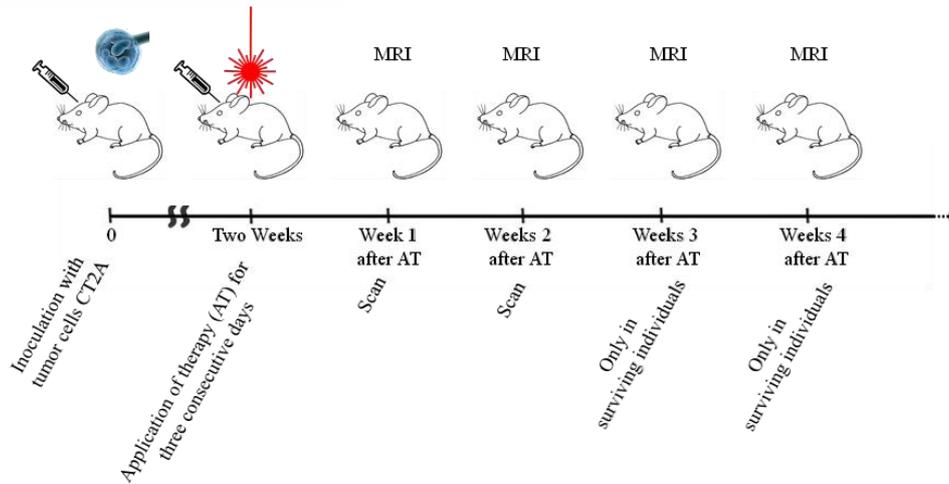


Diagrama 1: Gráfico resumen de la metodología, tomada de Casanova-Carvajal et al.⁽²⁹⁾

Resultados

Los observadores vieron que, con respecto al tamaño y la ubicación del tumor, las imágenes de resonancia magnética se correlacionaron con gran precisión con los resultados del análisis histopatológico (Figura 8).

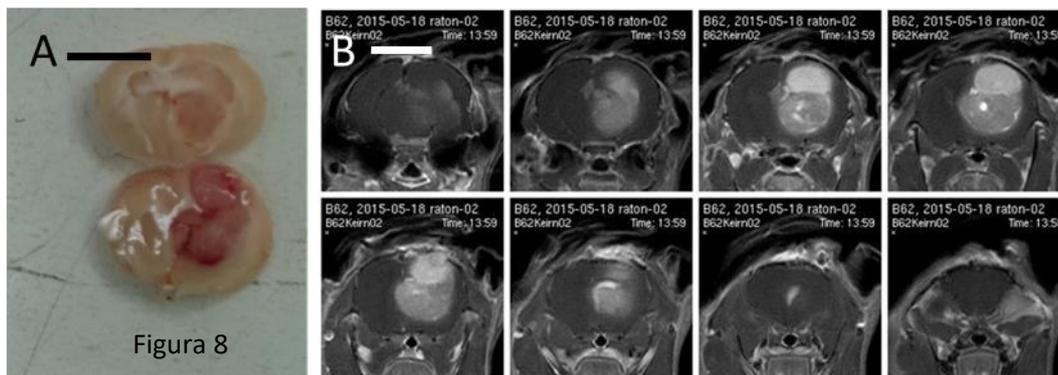


Figura 8. Caracterización de tumores cerebrales inducidos por CT-2A. A. Cortes coronales de 1 mm de espesor a través del mismo cerebro de ratón con una masa tumoral CT-2A hemorrágica que se encuentra en el hemisferio cerebral derecho, 28 días después de la inyección de células CT-2A. La fotografía se tomó después de una resonancia magnética in vivo (B) y la extracción del cerebro en el momento de la necropsia para histología. B, los paneles representan imágenes ponderadas en T1 (postcontraste con gadolinio) a diferentes niveles rostro-caudal correspondientes al mismo tumor CT-2A experimental representado en A, que muestran la progresión del tumor cuatro semanas después del implante celular. Observe en B una señal hiperintensa en el borde del tumor que indica que el borde del tumor está bien vascularizado y también una hipoatenuación en las regiones centrales del tumor que sugiere necrosis. Barras de escala: A, B = 4 mm. Imagen tomada de Casanova-Carvajal et al.⁽²⁹⁾

Análisis de RMI: En este apartado, el papel del técnico es de extrema importancia. Así, la RM convencional ponderada en T2 y T1 (antes y después del contraste con gadolinio) proporciona una sensibilidad excepcional para detectar y delimitar la ubicación de los tumores intracraneales experimentales (Figuras 4, 8, 10). El reconocimiento de tumores intracraneales mejora notablemente con la administración previa de gadolinio, con un límite de resolución de 0,8-1 mm³. Las imágenes ponderadas en T1 con realce de la vascularización con gadolinio se utilizaron de forma rutinaria para detectar la ubicación, los márgenes, el tamaño, la vascularización y el crecimiento del tumor. Las imágenes de RM con respecto al tamaño y la ubicación del tumor se correlacionaron con precisión con los resultados del análisis histopatológico de

este estudio (Figura 8). Las imágenes ponderadas en T1 revelaron una masa bien definida de realce heterogéneo que surge en el núcleo CP del cerebro (Figuras 4, 8, 10), extendiéndose desde este lugar inicial de trasplante rostro-caudalmente pasados unos días, eventualmente involucrando la corteza cerebral y el hipocampo (Figura 9B). La progresión del tumor se verifica mediante la realización de RMIs en serie a lo largo del tiempo, obteniéndose con éxito imágenes semanales de tumores CT-2A experimentales (Figuras 8, 10). El tumor experimental se caracteriza por un crecimiento rápido que apenas se detecta 1 semana después de la inyección volviéndose insoportable para el animal a las 4 semanas (Figura 10B). En ese momento los ratones comienzan a presentar complicaciones neurológicas por lo que tienen que ser sacrificados. El crecimiento del tumor dio como resultado una marcada deformación de los terceros ventrículos lateral y dorsal. En las imágenes ponderadas en T1 se observa con frecuencia una "hipoatenuación" central del tumor que sugiere necrosis central (Figura 8), lo que se confirma en el análisis histológico de esos casos. El crecimiento del tumor provoca signos de destrucción del parénquima cerebral y de aumento de la presión dentro del cerebro a medida que invadía las estructuras cerebrales vecinas. Pasados de 20-25 días después del trasplante de las células tumorales CT-2A, los ratones comienzan a mostrar signos de presión intracraneal elevada. Los síntomas como letargo o disfunción motora con postura encorvada, mal aseo, retraso del crecimiento y pérdida de peso son comunes. La periferia del tumor tiene en todos los casos un suministro de sangre bien establecido, como lo revela el patrón mejorado en las imágenes ponderadas en T1 con gadolinio (Figura 2B).

El crecimiento tumoral lo analizaron en dos momentos: una semana después de la irradiación láser (semana 1), y dos semanas después (semana 2). En la figura 9 se muestran diferencias estadísticamente significativas en las proporciones de volumen tumoral entre los grupos tratados (GNRs+láser) y el control (tumor sin tratar) que proporcionan información sobre la evolución del tumor en términos de porcentaje del volumen tumoral con respecto al volumen total del cerebro.

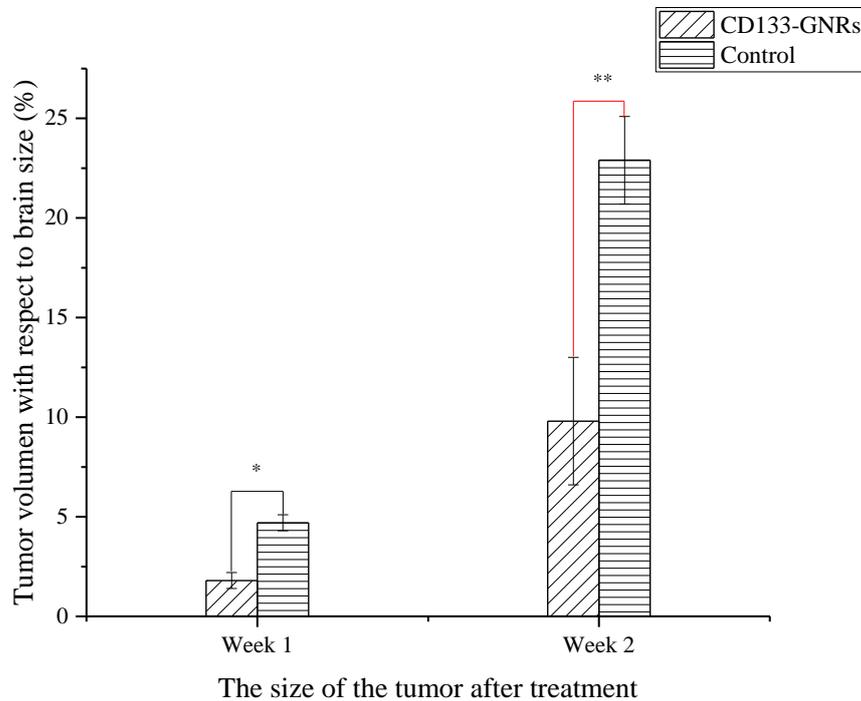


Figura 9. Resumen de datos volumétricos. Volumen tumoral (expresado como porcentaje del volumen cerebral total) en ratones control (PBS) y ratones de tratamiento con GNRs+láser las semanas 1 y 2 (períodos de tiempo después de la irradiación con láser). Los datos representan la media \pm SEM de $n = 3$ experimentos independientes. La prueba T de Student reveló una diferencia significativa ($p = 0,03$) entre los ratones de control y los ratones de tratamiento con láser GNRs en la semana 1. El tratamiento con láser GNRs alcanzó un beneficio significativo ** en la semana 2 ($p = 0,008$) Tomada de Casanova et al.⁽²⁹⁾

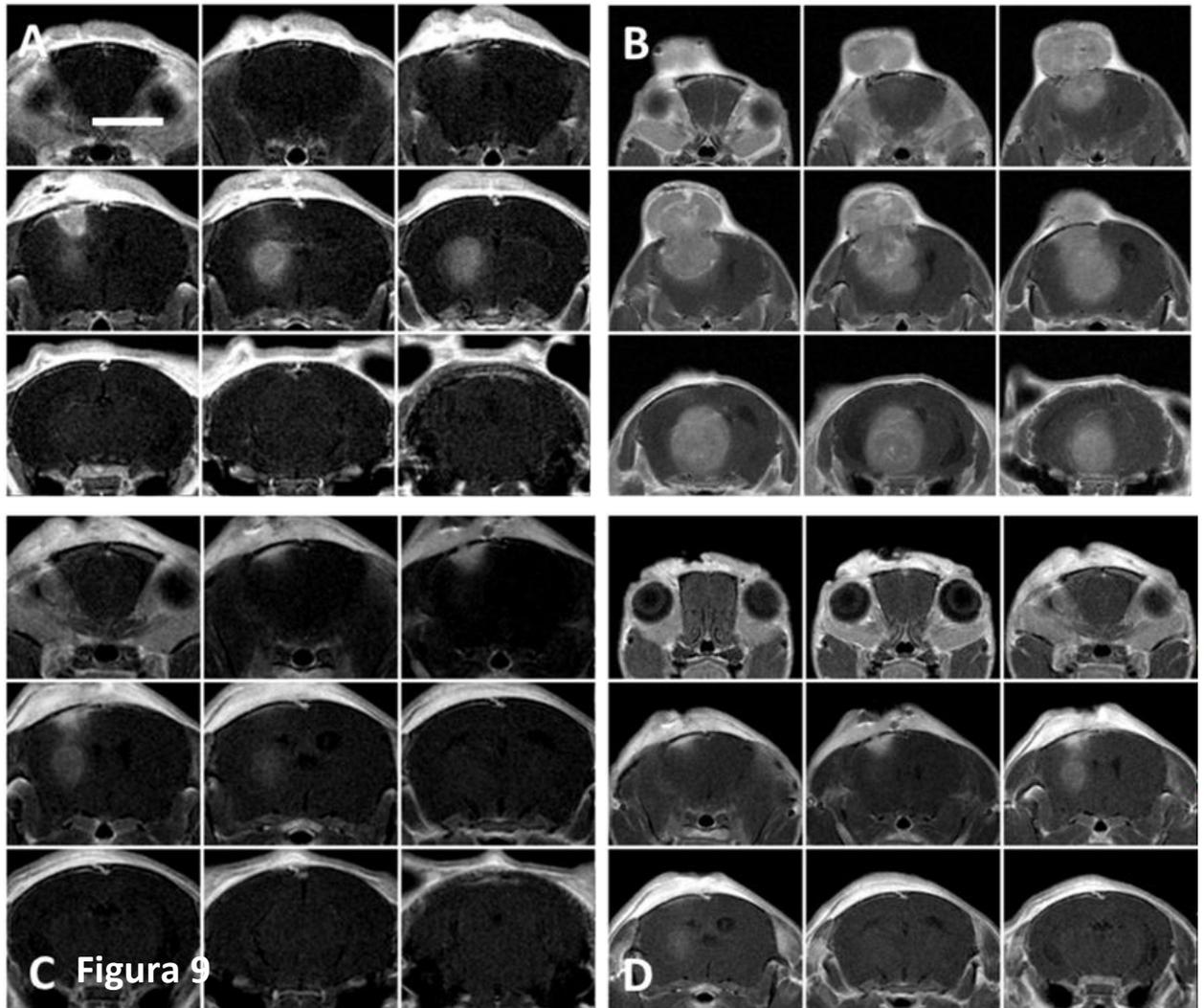


Figura 10.- Muestra imágenes de RMI de dos ratones elegidos al azar de ambos grupos: control (suero salino+láser): A, B; y tratados (GNRs+láser): C, D; en la "semana 1" (A, C) y "semana 2" (B, D) tras el tratamiento hipertérmico (láser). Estas imágenes muestran una aparente desaceleración en la progresión tumoral en el grupo GNRs+Laser (C,D) representada gráficamente en la figura 9. Tomada de Casanova et al.⁽²⁹⁾

Discusión

El uso de RMI en estudios experimentales dirigidos a la búsqueda de tratamientos eficaces frente a tumores primarios de origen glial constituye un procedimiento metodológico consistente y eficaz^(27,41), equiparable al uso de esta tecnología en clínica humana^(39,40). Por otro lado, la característica de progresión del tumor CT-2A demuestra que es muy similar a la observada en clínica humana⁽¹³⁾. Finalmente, el tratamiento experimental de hipertermia óptica resulta eficaz obteniéndose resultados estadísticamente significativos ya a la primera semana desde el inicio del tratamiento ($p < 0.05$), siendo muy evidente a las dos semanas ($p < 0.008$). En conclusión, se puede afirmar que el uso de RMI en el tipo de modelo animal de tumor cerebral tras trasplante intracerebral de células tumorales es de gran ayuda para evaluar la eficacia de tratamientos antitumorales. El procedimiento metodológico de RMI no presenta limitaciones para este tipo de estudios. Los ratones tratados con GNRs+láser muestran un claro comportamiento de reducción tumoral por consecuencia del tratamiento hipertérmico. El tratamiento hipertérmico se basa en la erradicación de las células tumorales justificado por la generación de calor en el sitio del tumor^(42,43). La hipertermia efectiva tiene lugar en el rango de temperatura de 41-46 °C activando muchos mecanismos de degradación celular que conducen a la apoptosis⁽⁴⁴⁾, limitando la proliferación celular con escasa afectación del tejido nervioso sano circundante. Las técnicas de hipertermia óptica mediante nanopartículas de oro son procedimientos bien conocidos en tecnologías biomédicas tanto *in vitro* e *in vivo* para el tratamiento de tumores^(29,45-47). Los resultados de este experimento proporcionan información esencial para ayudar a mejorar la terapia fototérmica para el tratamiento de tumores primarios del cerebro en clínica humana. La terapia fototérmica mediada por nanopartículas de oro podría ser una herramienta nueva y mínimamente invasiva para el tratamiento del cáncer. Este método también podría proporcionar una ayuda adicional a la cirugía para extirpar completamente los tumores cerebrales.

Para el cumplimiento de los objetivos propuestos relacionados con la evaluación de la eficacia del tratamiento fototérmico, describo el uso de la técnica de RMI, que permite analizar el volumen de los tumores resultantes tras el implante intracerebral de la línea



tumoral CT-2A en ratones C57BL/6. Este procedimiento de análisis usando RMI se correlaciona con el hecho de que uno de los parámetros más utilizados en el estudio sobre la eficacia de terapias para el GBM es la obtención de datos volumétricos tras tratamiento, tanto en animales de experimentación como en humanos⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾.

Conclusiones

Los resultados de este estudio experimental proporcionan información esencial que ayuda a comprender e implementar la importancia de la terapia fototérmica para el tratamiento de tumores primarios del sistema nervioso, como el GBM. Por otro lado, el modelo *in vivo* de tumor CT-2A exhibe características comunes con el GBM humano, como observan los autores por histopatología e inmunohistoquímica en estudios anteriores^(27,29,48) y procedimientos de imagen no invasivos (MRI)^(48,49,51). Por este motivo, la posibilidad de traslación de estos resultados a la patología humana según los autores son muy posibles.

Mediante sus resultados, los autores demuestran que la terapia térmica mediada por nanopartículas de oro podría ser una herramienta nueva, mínimamente invasiva, para el tratamiento del cáncer. Este método también podría proporcionar una ayuda adicional a la cirugía para extirpar completamente los tumores cerebrales evitando recidivas.

Por los resultados de su investigación, los autores demuestran que la terapia fototérmica con láser promueve muy eficazmente un efecto tumoricida en el modelo de astrocitoma CT-2A *in vivo*. Este efecto explican que se correlaciona con resultados previos *in vitro*⁽⁵²⁾. Los autores concluyen que la terapia fototérmica utilizando nanopartículas de oro irradiadas con láser constituye una alternativa prometedora para el tratamiento de neoplasias intracraneales en humanos. La efectiva reducción del volumen del tumor intracraneal después de este procedimiento puede considerarse como un logro sobresaliente en el tratamiento de este tipo de cáncer mortal ya que abre nuevas vías en la comprensión y el tratamiento del cáncer cerebral primario, lo que respalda futuras investigaciones en este campo.

La técnica RMI es mayoritariamente utilizada por los laboratorios dedicados a estudios preclínicos sobre modelos animales de enfermedad tumoral humana. Son varias las motivaciones. Por un lado, la RMI obtiene mayor realce de los límites del tumor, factor que facilita un mejor cálculo de su volumen en los estudios de su seguimiento^(27,29,36,37). Asimismo, no precisa de exposición de los animales de experimentación a radiaciones, lo que evita una gestión de la contención, identificación y retirada de los residuos

radiactivos, permitiendo realizar estudios longitudinales sencillos en el mismo animal durante semanas.

Bibliografía

1. Anderson JC, McFarland BC, Gladson CL. New molecular targets in angiogenic vessels of glioblastoma tumours. *Expert Rev Mol Med*. 2008 Aug 7;10:e23. doi: 10.1017/s1462399408000768
2. Sanson M. Editorial review: targets for glioma treatment: from bench to bedside. [Internet]. Vol. 20, *Current opinion in oncology*. United States; 2008. p. 650–1. doi: 10.1097/CCO.0b013e328313e188
3. Akter F, Simon B, de Boer NL, Redjal N, Wakimoto H, Shah K. Pre-clinical tumor models of primary brain tumors: Challenges and opportunities [Internet]. Vol. 1875, *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. Elsevier B.V.; 2021 [cited 2021 Apr 18]. p. 188458. doi: 10.1016/j.bbcan.2020.188458
4. Susanto E, Marin Navarro A, Zhou L, Sundström A, van Bree N, Stantic M, et al. Modeling SHH-driven medulloblastoma with patient iPS cell-derived neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2020 Aug;117(33):20127–38. doi: 10.1073/pnas.1920521117
5. Aslan K, Turco V, Blobner J, Sonner JK, Liuzzi AR, Núñez NG, et al. Heterogeneity of response to immune checkpoint blockade in hypermutated experimental gliomas. *Nat Commun* [Internet]. 2020 Feb;11(1):931. doi: 10.1038/s41467-020-14642-0
6. Jain KK. A Critical Overview of Targeted Therapies for Glioblastoma. *Front Oncol* [Internet]. 2018;8:419. doi: 10.3389/fonc.2018.00419
7. Bahmad HF, Poppiti RJ. Medulloblastoma cancer stem cells: molecular signatures and therapeutic targets. *J Clin Pathol* [Internet]. 2020 May 1;73(5):243 LP – 249. doi: 10.1136/jclinpath-2019-206246
8. da Hora CC, Schweiger MW, Wurdinger T, Tannous BA. Patient-Derived Glioma Models: From Patients to Dish to Animals. *Cells* [Internet]. 2019 Sep;8(10). doi: 10.3390/cells8101177
9. Joshi P, Katsushima K, Zhou R, Meoded A, Stapleton S, Jallo G, et al. The therapeutic and diagnostic potential of regulatory noncoding RNAs in medulloblastoma. *Neuro-oncology Adv* [Internet]. 2019;1(1):vdz023. doi: 10.1093/noajnl/vdz023
10. Meel MH, Kaspers GJL, Hulleman E. Preclinical therapeutic targets in diffuse midline glioma. *Drug Resist Updat* [Internet]. 2019 May;44:15–25. doi: 10.1016/j.drug.2019.06.001
11. Momota H, Holland EC. Mouse models of CNS embryonal tumors. *Brain Tumor*

- Pathol [Internet]. 2009;26(2):43–50. doi: 10.1007/s10014-009-0253-0
12. Blümcke I, Coras R, Wefers AK, Capper D, Aronica E, Becker A, et al. Review: Challenges in the histopathological classification of ganglioglioma and DNT: microscopic agreement studies and a preliminary genotype-phenotype analysis. *Neuropathol Appl Neurobiol* [Internet]. 2019 Feb;45(2):95–107. doi: 10.1111/nan.12522
 13. Sharifi G, Pajavand AM, Nateghinia S, Meybodi TE, Hasooni H. Glioma Migration Through the Corpus Callosum and the Brainstem Detected by Diffusion and Magnetic Resonance Imaging: Initial Findings. *Front Hum Neurosci* [Internet]. 2019;13:472. doi: 10.3389/fnhum.2019.00472
 14. Yang C, Tan Y, Li S, Zhou J, Wang Q, Wang Y, et al. Genomic landscapes by multiregion sequencing combined with circulation tumor DNA detection contribute to molecular diagnosis in glioblastomas. *Aging (Albany NY)* [Internet]. 2019 Dec;11(23):11224–43. doi: 10.18632/aging.102526
 15. Hakar MH, Wood MD. Updates in Pediatric Glioma Pathology. *Surg Pathol Clin* [Internet]. 2020;13(4):801–16. doi: 10.1016/j.path.2020.08.006
 16. Silva V de CJ da, Silva R de NO, Colli LG, Carvalho MHC de, Rodrigues SF. Gold nanoparticles carrying or not anti-VEGF antibody do not change glioblastoma multiforme tumor progression in mice. *Heliyon* [Internet]. 2020 Nov;6(11):e05591. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e05591
 17. Wang H, Pan J, Yu L, Meng L, Liu Y, Chen X. MicroRNA-16 Inhibits Glioblastoma Growth in Orthotopic Model by Targeting Cyclin D1 and WIP1. *Onco Targets Ther* [Internet]. 2020 Oct 1;Volume 13:10807–16. doi: 10.2147/OTT.S250369
 18. Mohme M, Maire CL, Geumann U, Schliffke S, Dührsen L, Fita K, et al. Local Intracerebral Immunomodulation Using Interleukin-Expressing Mesenchymal Stem Cells in Glioblastoma. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2020 Jun 1;26(11):2626 LP – 2639. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-0803
 19. Ladomersky E, Zhai L, Lauing KL, Bell A, Xu J, Kocherginsky M, et al. Advanced Age Increases Immunosuppression in the Brain and Decreases Immunotherapeutic Efficacy in Subjects with Glioblastoma. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2020 Oct 1;26(19):5232 LP – 5245. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-3874
 20. Xia Q, Zhang H, Zhang P, Li Y, Xu M, Li X, et al. Oncogenic Smurf1 promotes PTEN wild-type glioblastoma growth by mediating PTEN ubiquitylation. *Oncogene* [Internet]. 2020 Sep;39(36):5902–15. doi: 10.1038/s41388-020-01400-1
 21. Hu X, Holland EC. Applications of mouse glioma models in preclinical trials. *Mutat Res Mol Mech Mutagen* [Internet]. 2005;576(1):54–65. doi: doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.08.023
 22. Wang J, Leavenworth JW, Hjelmeland AB, Smith R, Patel N, Borg B, et al.

- Deletion of the RNA regulator HuR in tumor-associated microglia and macrophages stimulates anti-tumor immunity and attenuates glioma growth. *Glia* [Internet]. 2019 Dec;67(12):2424–39. doi: 10.1002/glia.23696
23. Zhou X, Li G, An S, Li W-X, Yang H, Guo Y, et al. A new method of identifying glioblastoma subtypes and creation of corresponding animal models. *Oncogene* [Internet]. 2018;37(35):4781–91. doi: 10.1038/s41388-018-0305-1
 24. Abate LE, Mukherjee P, Seyfried TN. Gene-linked shift in ganglioside distribution influences growth and vascularity in a mouse astrocytoma. *J Neurochem* [Internet]. 2006 Sep 1;98(6):1973–84. doi: doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04097.x
 25. Lai CPK, Bechberger JF, Naus CC. Pannexin2 as a novel growth regulator in C6 glioma cells. *Oncogene* [Internet]. 2009;28(49):4402–8. doi: 10.1038/onc.2009.283
 26. Liu CJ, Schaettler M, Blaha DT, Bowman-Kirigin JA, Kobayashi DK, Livingstone AJ, et al. Treatment of an aggressive orthotopic murine glioblastoma model with combination checkpoint blockade and a multivalent neoantigen vaccine. *Neuro Oncol* [Internet]. 2020 Sep;22(9):1276–88. doi: 10.1093/neuonc/noaa050
 27. Martínez-Murillo R, Martínez A. Standardization of an orthotopic mouse brain tumor model following transplantation of CT-2A astrocytoma cells. *Histol Histopathol* [Internet]. 2008 Jan 1;22:1309–26. doi: 10.14670/HH-22.1309
 28. Riva M, Wouters R, Weerasekera A, Belderbos S, Nittner D, Thal DR, et al. CT-2A neurospheres-derived high-grade glioma in mice: a new model to address tumor stem cells and immunosuppression. *Biol Open* [Internet]. 2019 Sep;8(9). doi: 10.1242/bio.044552
 29. Casanova-Carvajal O, Urbano-Bojorge AL, Ramos M, Serrano-Olmedo JJ, Martínez-Murillo R. Slowdown intracranial glioma progression by optical hyperthermia therapy: study on a CT-2A mouse astrocytoma model. *Nanotechnology* [Internet]. 2019;30(35):355101. doi: 10.1088/1361-6528/ab2164
 30. Mukherjee P, Augur ZM, Li M, Hill C, Greenwood B, Domin MA, et al. Therapeutic benefit of combining calorie-restricted ketogenic diet and glutamine targeting in late-stage experimental glioblastoma. *Commun Biol* [Internet]. 2019;2(1):200. doi: 10.1038/s42003-019-0455-x
 31. Seyfried TN, El-Abbadi M, Roy ML. Ganglioside distribution in murine neural tumors. *Mol Chem Neuropathol* [Internet]. 1992 Oct;17(2):147–67. doi: 10.1007/BF03159989
 32. Binello E, Qadeer ZA, Kothari HP, Emdad L, Germano IM. Stemness of the CT-2A Immunocompetent Mouse Brain Tumor Model: Characterization In Vitro. *J Cancer* [Internet]. 2012;3:166–74. doi: 10.7150/jca.4149
 33. Buck AK, Herrmann K, Shen C, Dechow T, Schwaiger M, Wester H-J. Molecular

imaging of proliferation in vivo: Positron emission tomography with [18F]fluorothymidine. *Methods* [Internet]. 2009;48(2):205–15. doi: doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.03.009

34. Waerzeggers Y, Viel T, Sch€afers S, Wagner S, Faust A, Riemann B, et al. Positron Emission Tomography-Based Molecular Imaging [Internet]. Martínez-Murillo R, Martínez A, editors. Springer, Humana Press, Totowa, NJ; 2013. 301–327 p. doi: 10.1007/7657_2012_36
35. Nigam S, Tatum D, Foster A, Plakseychuk E, Edinger R, Edwards W, et al. SPECT and PET imaging of CD11b-positive immune cells in an orthotopic mouse model of glioma with Zr-89 and Lu-177 labeled Lumi804-anti-CD11b antibody. *J Nucl Med* [Internet]. 2020 May 1;61(supplement 1):621 LP – 621.
36. Xie T, Chen X, Fang J, Xue W, Zhang J, Tong H, et al. Non-invasive monitoring of the kinetic infiltration and therapeutic efficacy of nanoparticle-labeled chimeric antigen receptor T cells in glioblastoma via 7.0-Tesla magnetic resonance imaging. *Cytotherapy* [Internet]. 2021;23(3):211–22. doi: doi.org/10.1016/j.jcyt.2020.10.006
37. Gossmann A, Helbich TH, Kuriyama N, Ostrowitzki S, Roberts TPL, Shames DM, et al. Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging as a surrogate marker of tumor response to anti-angiogenic therapy in a xenograft model of glioblastoma multiforme. *J Magn Reson Imaging* [Internet]. 2002 Mar 1;15(3):233–40. doi: https://doi.org/10.1002/jmri.10072
38. Fernandez Cabada T, Sanchez Lopez de Pablo C, Martinez Serrano A, del Pozo Guerrero F, Serrano Olmedo JJ, Ramos Gomez M. Induction of cell death in a glioblastoma line by hyperthermic therapy based on gold nanorods. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2012;7:1511–23. doi: 10.2147/ijn.s28470
39. Huang S, Michalek JE, Reardon DA, Wen PY, Floyd JR, Fox PT, et al. Assessment of tumor hypoxia and perfusion in recurrent glioblastoma following bevacizumab failure using MRI and 18F-FMISO PET. *Sci Rep* [Internet]. 2021;11(1):7632. doi: 10.1038/s41598-021-84331-5
40. Overcast WB, Davis KM, Ho CY, Hutchins GD, Green MA, Graner BD, et al. Advanced imaging techniques for neuro-oncologic tumor diagnosis, with an emphasis on PET-MRI imaging of malignant brain tumors. *Curr Oncol Rep* [Internet]. 2021;23(3):34. doi: 10.1007/s11912-021-01020-2
41. Agliardi G, Liuzzi AR, Hotblack A, De Feo D, Núñez N, Stowe CL, et al. Intratumoral IL-12 delivery empowers CAR-T cell immunotherapy in a pre-clinical model of glioblastoma. *Nat Commun* [Internet]. 2021;12(1):444. doi: 10.1038/s41467-020-20599-x
42. Gupta R, Sharma D. Evolution of Magnetic Hyperthermia for Glioblastoma Multiforme Therapy. *ACS Chem Neurosci* [Internet]. 2019 Mar 20;10(3):1157–72. doi: 10.1021/acscchemneuro.8b00652
43. Day ES, Thompson PA, Zhang L, Lewinski NA, Ahmed N, Drezek RA, et al.

Nanoshell-mediated photothermal therapy improves survival in a murine glioma model. *J Neurooncol* [Internet]. 2011 Aug;104(1):55–63. doi: 10.1007/s11060-010-0470-8

44. Tapeinos C, Marino A, Battaglini M, Migliorin S, Brescia R, Scarpellini A, et al. Stimuli-responsive lipid-based magnetic nanovectors increase apoptosis in glioblastoma cells through synergic intracellular hyperthermia and chemotherapy. *Nanoscale* [Internet]. 2019;11(1):72–88. doi: 10.1039/C8NR05520C
45. Gong W, Wang Z, Liu N, Lin W, Wang X, Xu D, et al. Improving efficiency of adriamycin crossing blood brain barrier by combination of thermosensitive liposomes and hyperthermia. *Biol Pharm Bull* [Internet]. 2011;34(7):1058–64. doi: 10.1248/bpb.34.1058
46. Li M, Li Z, Yang Y, Wang Z, Yang Z, Li B, et al. Thermo-Sensitive Liposome co-Loaded of Vincristine and Doxorubicin Based on Their Similar Physicochemical Properties had Synergism on Tumor Treatment. *Pharm Res* [Internet]. 2016 Aug;33(8):1881–98. doi: 10.1007/s11095-016-1924-2
47. Wang S, Xin J, Zhang L, Zhou Y, Yao C, Wang B, et al. Cantharidin-encapsulated thermal-sensitive liposomes coated with gold nanoparticles for enhanced photothermal therapy on A431 cells. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2018;13:2143–60. doi: 10.2147/IJN.S156240
48. Abecassis IJ, Cordy B, Durfy S, Andre JB, Levitt MR, Ellenbogen RG, et al. Evaluating angioarchitectural characteristics of glial and metastatic brain tumors with conventional magnetic resonance imaging. *J Clin Neurosci* [Internet]. 2020 Jun;76:46–52. doi: 10.1016/j.jocn.2020.04.051
49. Bolcaen J, Descamps B, Boterberg T, Vanhove C, Goethals I. PET and MRI Guided Irradiation of a Glioblastoma Rat Model Using a Micro-irradiator. *J Vis Exp* [Internet]. 2017 Dec 28;2017. doi: 10.3791/56601
50. Hotchkiss KM, Sampson JH. Temozolomide treatment outcomes and immunotherapy efficacy in brain tumor. *J Neurooncol* [Internet]. 2021 Jan;151(1):55–62. doi: 10.1007/s11060-020-03598-2
51. Kubelt C, Peters S, Ahmeti H, Huhndorf M, Huber L, Cohrs G, et al. Intratumoral Distribution of Lactate and the Monocarboxylate Transporters 1 and 4 in Human Glioblastoma Multiforme and Their Relationships to Tumor Progression-Associated Markers. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Aug;21(17). doi: 10.3390/ijms21176254
52. Sharma SK, Shrivastava N, Rossi F, Tung LD, Thanh NTK. Nanoparticles-based magnetic and photo induced hyperthermia for cancer treatment. *Nano Today* [Internet]. 2019;29:100795. doi: doi.org/10.1016/j.nantod.2019.100795