

# AS ESTRATÉGIAS EXPERIMENTAIS MAIS COMUNS PARA O ESTUDO DOS GLIOMAS

*Data de aceite: 03/06/2024*

### **Danielle da Silva Fraga Gomes**

Programa associado de Pós-graduação em Biotecnologia Marinha, Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM) e Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFF), Arraial do Cabo, RJ, Brazil  
Divisão de Bioprodutos, Departamento de Biotecnologia Marinha, Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM), Arraial do Cabo, RJ, Brazil  
<https://orcid.org/0000-0003-1155-9005>

### **Roberta da Costa Escalera**

Programa associado de Pós-graduação em Biotecnologia Marinha, Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM) e Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFF), Arraial do Cabo, RJ, Brazil  
Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB), Hospital Naval Marcílio Dias (HNMD), Rio de Janeiro, RJ, Brazil  
<https://orcid.org/0000-0002-3709-8174>

### **Giselle Pinto de Faria Lopes**

Programa associado de Pós-graduação em Biotecnologia Marinha, Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM) e Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFF), Arraial do Cabo, RJ, Brazil  
Divisão de Bioprodutos, Departamento de Biotecnologia Marinha, Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM), Arraial do Cabo, RJ, Brazil  
<https://orcid.org/0000-0001-9502-2314>

**RESUMO:** O glioma é um tumor altamente maligno que pode ser originado das células gliais do sistema nervoso. O glioblastoma (GBM) é o tumor cerebral maligno e mais comum em adultos. Esta doença é extremamente desafiadora, pois a detecção do tumor ocorre tardiamente e as células infiltrantes ficam quiescentes junto da barreira hematoencefálica. Em anos, seu prognóstico não melhorou significativamente. Apesar do desenvolvimento de estratégias diagnósticas e novas terapias disponíveis, os tratamentos são muito invasivos e podem oferecer ao paciente apenas alguns meses de vida. Portanto, o desenvolvimento de modelos de estudo pré-clínicos que tentem simular o microambiente tumoral é de grande importância, uma vez que possibilitam o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento. Nesta revisão, apresentamos informações sobre a doença, os modelos de estudo mais comuns atualmente utilizados e os desafios existentes.

**PALAVRAS-CHAVE:** tumor cerebral, modelo, tratamento.

## THE MOST COMMON EXPERIMENTAL STRATEGIES FOR STUDYING GLIOMAS

**ABSTRACT:** Glioma is a highly malignant tumor that originates from the glial cells of the nervous system. Glioblastoma (GBM) is the most common malignant brain tumor in adults. However, this disease is extremely challenging to treat because the tumor is detected late, and the infiltrating cells remain inactive near the blood-brain barrier. Unfortunately, the prognosis has not significantly improved in recent years. Though diagnostic strategies and new therapies are available, they are very invasive and may only add a few months to a patient's life. Therefore, developing pre-clinical study models that simulate the tumor microenvironment is crucial. This approach enables the development of new treatment strategies. In this review, we present information about the disease, the most common study models currently used, and the existing challenges.

**KEYWORDS:** brain tumor, model, treatment.

### INTRODUÇÃO

Os tumores cerebrais mais comuns em humanos são chamados de gliomas, são tumores malignos muito agressivos que se originam nas células gliais (Lakkadwala, 2019). Dentre os tipos de gliomas, há um alto índice de tumores, conhecidos como glioblastoma (GBM). Schaff (2023), esclarece que aproximadamente 49% dos tumores malignos são GBMs. O GBM foi descrito pela primeira vez em 1863, pelo alemão Rudolf Virchow, como um tipo de glioma (Boccellato&Rehm, 2022). O GBM é derivado de uma transformação maligna de astrócitos, oligodendrócitos ou de suas células progenitoras, mas surge mais frequentemente de astrócitos e é extremamente invasivo, muitas vezes recrutando tecido saudável para o tecido tumoral, sendo considerado um dos cânceres humanos mais mortais (Stanke&Kidambi, 2023). Essas características resultam na atribuição do grau IV para este glioma, o grau mais alto na classificação oficial de tumores da Organização Mundial da Saúde (OMS) (Yao *et al.*, 2018).

As células do GBM apresentam características peculiares que culminam em inúmeros desafios, o tumor é heterogêneo apresentando uma população de células que possuem diferentes perfis mutacionais e diferentes fenótipos em termos de morfologia, autorrenovação, capacidade proliferativa e sensibilidade terapêutica (Pliakopanou *et al.*, 2024). Butler *et cols.* (2020), esclarecem que o grande desafio de se tratar o GBM ocorre devido às variações fenotípicas das células-tronco neurais. O grupo explica que essas variações são determinadas pelo microambiente tumoral, que se refere a todas as moléculas, células e estruturas que abrangem e sustentam outras células e tecidos. As células do GBM interagem com células normais específicas através de fatores solúveis ou contatos diretos entre células, promovendo assim a especificidade e invasão tumoral (Krieger *et al.*, 2020). A detecção do tumor também é um desafio para o tratamento, pois ocorre tardiamente devido ao fato das células se infiltrarem e se esconderem junto

da barreira hematoencefálica em estado quiescente. Portanto, apesar da inovação no desenvolvimento de terapias e estratégias, o prognóstico da doença não tem demonstrado melhora significativa, permanecendo ainda uma doença sem cura (Robertson *et al.*, 2019; Maher & Bachoo., 2014).

Quanto aos sintomas, que podem aparecer à medida que a doença progride, podem estar relacionados com o papel funcional da área cerebral afetada, geralmente as apresentações clínicas incluem fraqueza persistente, dormência, perda de visão ou alterações na linguagem (Boccellato *et al.*, 2022). Outros sintomas iniciais também incluem mudança sutil de personalidade, dor de cabeça e deficiência intelectual; queixas específicas e achados físicos localizados no local da lesão (Salcman, 1980). Podem ter localizações diferentes, mas são encontrados principalmente nas áreas superficiais, especialmente nos lobos frontal e temporal, enquanto apenas uma pequena porcentagem ocorre no cerebelo, tronco cerebral e medula espinhal (Nakada *et al.*, 2011).

## **DESAFIOS NO TRATAMENTO E DESENVOLVIMENTO DE NOVAS TERAPIAS**

O GBM é uma doença de difícil tratamento e responsável por mais mortes em pessoas com menos de 40 anos do que qualquer outro câncer (Mega *et al.*, 2020; Boccellato & Rehm, 2022). A alta taxa de mortalidade e o mau prognóstico clínico do GBM são preocupações para muitos pacientes, médicos e pesquisadores. Sabe-se que menos de 7% dos pacientes com GBM sobrevivem mais de 5 anos após o diagnóstico da doença e a maioria dos pacientes morre da doença no período máximo de 1 ano após o diagnóstico devido à resistência à quimioterapia. O mau prognóstico da doença é resultado de células transformadas agitadas pelo microambiente tumoral e apesar dos avanços em pesquisas e tratamentos como radioterapia, quimioterapia e neurocirurgia, o tempo médio de sobrevivência dos pacientes gira em torno de 9 a 16 meses (Zhang *et al.*, 2020; Stanke&Kidambi, 2023).

Estudos da literatura esclarecem os pontos que dificultam o sucesso da terapia com GMB: detecção tardia de tumores com extensa heterogeneidade celular e genética; mudanças em vários níveis de crescimento e sobrevivência celular, interação de células tumorais com microambiente cerebral diversificado e complexo; células dormentes ou quiescentes resistentes a terapias citotóxicas; extensa infiltração no parênquima do SNC, o que inviabiliza a cirurgia de gliomas difusos, tornando a ressecção total do tumor muito complexa e de difícil execução (Chen *et al.*, 2012; Quail& Joyce, 2017; Dimension, 2021). Outro fator relevante é a limitação da barreira hematoencefálica (BHE), limitando a biodisponibilidade de medicamentos, além da angiogênese; e diversas variantes subclonais que prejudicam as terapias direcionadas e levam à recuperação.

Atualmente, o tratamento disponível consiste em ressecção cirúrgica com tentativa de remover o máximo possível da massa tumoral, quimiorradiação combinada com

temozolomida, e algumas vezes imunoterapia experimental (Stupp *et al.*, 2017; Mpekris *et al.*, 2020). Weil *et al.*, (2017) esclarece que apesar deste tratamento intensivo, a resistência tumoral e a recorrência limitam a sua eficácia e que uma das principais causas do insucesso do tratamento é o aparecimento precoce e generalizado disseminação de células tumorais, tornando os gliomas uma doença de todo o cérebro. Osswald *et cols.* (2015), ressalta que os tumores cerebrais astrocíticos, incluindo os glioblastomas, são neoplasias incuráveis caracterizadas por crescimento difusamente infiltrativo. O GBM cria uma rede de comunicação com outras células não tumorais, criando um ambiente favorável, induzindo alterações fenotípicas em células não tumorais do tecido cerebral, inibindo a atividade do sistema imunológico em relação às células tumorais (Touat *et al.*, 2017). Assim, as células de GBM respondem dinamicamente ao seu microambiente tecidual local revelando-se extremamente difícil de eliminar completamente (Calabrese *et al.*, 2007; Zamecnik, 2005).

Há relatos de que alguns pacientes ainda conseguem atingir a remissão da doença após tratamento completo, com cirurgia, radioterapia e quimioterapia, porém essa remissão é breve e invariavelmente seguida de recorrência e progressão tumoral (Janbazian *et al.*, 2014). Muitos esforços foram feitos nas últimas décadas por pesquisadores e médicos para desenvolver novos medicamentos para melhorar as terapias que existem atualmente para tratar o GBM (Yao *et al.*, 2018). Além disso, todas as características que dificultam o desenvolvimento de terapias eficazes também dificultam o estudo *in vitro* em modelo de origem humana (Krieger *et al.*, 2020). Um alvo terapêutico para o tratamento do GBM são a microglia e os macrófagos, porque uma grande proporção do microambiente tumoral consiste em um infiltrado inflamatório predominante por micróglia e macrófagos, que se acredita serem transformados pelas células do GBM para o crescimento do tumor, sendo assim seus papéis emergentes na progressão é impulsionada pela investigação de estratégias terapêuticas que visam a sua modificação ou eliminação (Poon *et al.*, 2017). Infelizmente, a maioria dos esforços ainda não alcançaram bons resultados a longo prazo em ensaios clínicos, embora alguns deles se mostrem promissores em modelos *in vivo*, deixando as opções de tratamento ainda muito limitadas (Yao *et al.*, 2018).

Na década de 1950, as primeiras linhagens celulares foram estabelecidas num modelo *in vitro*, a linhagem celular estabelecida foi o carcinoma do cólon uterino humano conhecido como células HELA. Luo *et cols.* (2020) explicam que as linhagens celulares são relativamente simples de manter, projetar, xenoenxertar e sequenciar, e portanto, a cultura celular ainda é um modelo amplamente utilizado para numerosos testes na fase pré-clínica da pesquisa e permaneceu um padrão para em modelos *in vitro*. Com o passar dos anos, as possibilidades de estudos utilizando cultura de células se expandiram através de modelos alternativos, surgiu o cultivo 3D com esferoides e organoides e atualmente a possibilidade de imprimir tecidos tumorais em 3D, replicando assim arquiteturas de tecidos *in vivo* como proposta de promessa de novas tecnologias em pesquisas científicas (Boccellato&Rehm, 2022). Quanto mais opções de possíveis modelos utilizados para estudo surgirem, maiores serão as vantagens para o desenvolvimento de novas terapias e melhor compreensão do funcionamento do maquinário que permite o surgimento e o crescimento da doença.

## ESTRATÉGIAS EXPERIMENTAIS *IN VITRO*

A pesquisa em modelos *in vitro* é mais adequada para a dissecação de propriedades intrínsecas às células, Robertson *et cols.*(2019),destacam que é possível neste modelo utilizar abordagens bioquímicas, biológicas celulares e genética reversa e é claro que isso vê as células cultivadas como autônomas. Considerando características básicas como crescimento e autossuficiência, isso permite gerar modelos escalonáveis de cenários celulares e simplificar abordagens experimentais como telas químicas/genéticas, transcriptômica, proteômica, análises clonais ou unicelulares sem considerar a complexidade dos sinais extrínsecos. Porém, considera-se esses, modelos de limitação da representação tumoral inserida no ambiente natural e suas conexões originais, além da limitação na preservação da diversidade celular e mutacional dos tumores parentais que requerem um tempo de geração prolongado (Jacob *et al.*, 2020). Robertson *et cols.* (2019), destacam que um dos principais riscos do trabalho com células cultivadas é que estas possam divergir, genética ou epigeneticamente, ao ponto de não serem relevantes para as doenças humanas e propõe que, para validar os resultados, sejam necessárias inovações, considerações e controles cuidadosos para garantir a relevância da doença de quaisquer novos resultados. Quanto às possibilidades de uma representação mais fiel e natural do microambiente GBM *in vivo* Carla *et cols.*(2019), afirmam que as diferenças utilizadas em modelos científicos experimentais que representem a doença comparados com a realidade do ambiente tumoral podem ser um fator que distancia a compreensão da doença e conseqüentemente o desenvolvimento de terapias. Trujillo-de-Santiago *et cols.* (2019) sugerem que a recriação *in vitro* ideal do nicho microtumoral é altamente desafiadora, embora necessária para uma melhor compreensão da etiologia do câncer e desenvolvimento de melhores terapias. Quanto mais próximo for possível adaptar estas culturas celulares e seus modelos, maior será o seu sucesso para os novos testes terapêuticos.

### Modelo bidimensional

No modelo *in vitro* bidimensional (2D) tradicional, as células são cultivadas sobre plástico ou em substratos de hidrogel, geralmente são cultivadas no fundo de uma garrafa como culturas em monocamada e mantidas em ambiente adequado e favorável ao seu crescimento, como meio de cultura específico, pH e temperatura (Conti *et al.*, 2005). Trabalhar com células em monocamadas aderentes oferece algumas vantagens experimentais devido à homogeneidade da cultura, abordagens de imagem, propagação/colheita clonal, triagem, quantificação, além de reproduzir rápida resposta à modulação ambiental (Wirtz *et al.*, 2011; Stroka *et al.*, 2014).

Caballero *et cols.* (2017) destacam múltiplas vantagens dos modelos 2D em comparação com os seus homólogos *in vitro*, sendo mais são simples, baratos, oferecem fácil

manipulação e apresentam alta capacidade de imagem, fornecem informações importantes sobre os determinantes mecanicistas da adesão e migração das células cancerígenas, uma característica fundamental da disseminação do tumor. Algumas diferenças e adaptações são permitidas para que o cultivo de células tumorais em ambiente artificial seja viável. No entanto, o estabelecimento de uma linhagem celular exerce pressão seletiva para sobreviver no plástico. A seleção adicional também ocorre de forma heterogênea após a distribuição das linhagens celulares, provavelmente devido em parte às diferenças nas condições de cultura empregadas em diferentes laboratórios (Luo&Weiss., 2020). Células tumorais como o GBM são tradicionalmente cultivadas *in vitro* em substrato plástico, com tensão de oxigênio de 20%, porém, a ausência de tensão de oxigênio do GBM *in vivo* varia de 0,1 a 10% (Evans *et al.*, 2004). Outra diferença é que nas culturas 2D, toda a superfície celular está em contato direto com o meio, alterando assim o crescimento celular e modificando a disponibilidade do medicamento (Guyonet *et al.*, 2020).

Em relação ao GBM, existe a opção de trabalhar com linhagens celulares “clássicas” condicionais ou modelos derivados de pacientes desenvolvidos mais recentemente, cultivados em condições de cultura de células-tronco neurais, as linhagens celulares “clássicas” amplamente utilizadas, como A172, U87MG, U251MG e T98G são cultivados em meios suplementados, mas essas condições de cultura promovem a diferenciação astrocítica (Robertson *et al.*, 2019). Em resumo, modelos 2D de cultura celular acabam simplificando demais as complexas interações célula a célula encontradas em tumores (Boccellato&Rehm, 2022), não imitando o crescimento ou ambiente tumoral *in vivo*, embora sejam ser uma ferramenta útil importante para iniciar estudos mecanísticos na fase pré-clínica.

## Modelo tridimensional

Os modelos 3D são capazes de apresentar resultados diferentes dos modelos 2D (Diao *et al.*, 2019). Os tumores são tecidos tridimensionais (3D) complexos que estabelecem uma conversa cruzada dinâmica com os tecidos circundantes através de sinalização química complexa (Trujillo-de Santiago *et al.*, 2019). Modelos tridimensionais de cultura 3D foram desenvolvidos para superar as limitações e dificuldades dos ensaios celulares em monocamada. Eles imitam uma arquitetura multicelular e também podem reproduzir a heterogeneidade dos tumores fornecendo uma estrutura de conjuntos de microcâmaras ocas contendo uma interface natural de colágeno, permitindo o crescimento de células GBM nas câmaras, simulando a difusão de nutrientes e oxigênio através do tecido, podendo ser utilizado para estudos de invasão através da matriz extracelular, vários em modelos *in vitro* foram construídos para melhor estudar as interações entre as células GBM e a matriz (Calabrese *et al.*, 2007; Cuddapah *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2016; Xiao, 2017). Portanto, este modelo celular atual apresenta propriedades específicas na morfologia celular, espectro, migração e invasão (Diao *et al.*, 2019). Dimension (2021), explica que modelos de cocultura

*in vitro* de GBM são necessários para compreender a conexão que existe entre as células GBM e o sistema imunológico do cérebro e o desenvolvimento de modelos inovadores de tumores 3D *in vitro* tem o potencial de preencher esta lacuna, servindo como uma ferramenta de triagem de novas moléculas capazes de se tornarem medicamentos anti-GBM. Pelas vantagens que o modelo 3D apresenta, eles podem ser mais relevantes para o estudo de tumores sólidos do que o modelo 2D (Guyon *et al.*, 2020). Modelos tridimensionais também podem ser utilizados para verificar a eficácia dos medicamentos e possíveis tratamentos. Um exemplo é o conhecimento dos mecanismos envolvidos na resistência à temozolomida, medicamentos atualmente disponíveis no mercado para o tratamento do GBM, o modelo 3D pode levar à identificação de novas estratégias que possibilitem o uso mais eficaz do atual padrão de tratamento (Musah-Eroje&Watson, 2019).

Dentre os principais modelos celulares tridimensionais encontram-se os esferóides, esses se originam-se da agregação espontânea de diversas células e podem variar em tamanho (Boccellato&Rehm, 2022), crescem como células flutuantes livres apoiadas em uma matriz, formando aglomerados que resultam em uma esfera. O modelo esferóide é atualmente considerado o modelo GBM *in vitro* mais preciso, às vezes referido como o padrão ouro na área (Suva &Tirosh, 2020). Uma das vantagens de usar o modelo 3D de esferóides é que eles mantêm a expressão genética e padrão genômico quase idênticos ao tumor original e quando dissociados em células individuais, essas células proliferam rapidamente formando esferóides secundários, que quando implantados em animais originam a formação de tumores semelhantes ao GBM (Dimension, 2021). A massa tumoral formada é capaz de impactar na difusão de oxigênio e nutrientes, a difusão de oxigênio é alterada quando o tamanho do esferóide atinge cerca de 300  $\mu\text{m}$ , induzindo um ambiente hipóxico no centro, essa difusão também tem impacto na resposta a fármacos testados, os metabólitos penetram menos nas camadas celulares, causando assim reações metabólicas compensatórias, quando o diâmetro do esferóide aumenta, áreas de necrose podem ser observadas, reproduzindo ainda mais as características encontradas em muitos cânceres sólidos como o GBM, que apresentam exatamente esta organização (Guyon *et al.*, 2020).

Outro modelo celular tridimensional utilizado em pesquisas é o organoide. Qian *et cols.* (2019) definem o conceito de organoides como agregados tridimensionais automontados gerados a partir de células-tronco pluripotentes com tipos de células e citoarquitecturas que se assemelham ao cérebro humano embrionário. Os organoides permitem modelar as características necróticas e hipóxicas de tumores humanos, juntamente com a correspondente maior gama de estados celulares quiescentes, proliferativos e de diferenciação (Hubert *et al.*, 2017). Os organoides de GBM são gerados a partir de células de pacientes (GBOs) reproduzem as características histológicas, diversidade celular, expressão gênica e perfis mutacionais de seus tumores parentais (Jacob., *et al* 2020). Esses podem ser gerados com alta confiabilidade e mostrar infiltração rápida e agressiva quando transplantados em cérebros de roedores adultos formando-se rapidamente e sendo sustentado por uma rede interconectada de microtubos tumorais que auxiliam na invasão do tecido normal do hospedeiro (Krieger *et al.*, 2020).

## Organ-on-chip/tumor-on-chip

Os modelos de simulação de *organ-on-chip* (OoC) e de *tumor-on-chip* surgiram recentemente como uma ferramenta promissora na pesquisa do câncer. Os sistemas *tumor-on-chip* (ToC), são dispositivos microfluídicos que conseguem criar características dinâmicas da fisiologia do tumor, o uso de microfluídica acrescenta outra dimensão de mimetismo fisiológico, permitindo uma alimentação contínua de nutrientes desses tecidos (Trujillo-de Santiago *et al.*, 2019). A tecnologia de biomateriais envolve, biologia celular e engenharia combinadas em uma plataforma miniaturizada com um baixo custo de fabricação (Abu-Dawas *et al.*, 2021; Danku *et al.*, 2022). Mamani *et cols.* (2020) ressaltam que no modelo de cultura celular 3D em chip, a microfluídica controlada externamente pode simular o fluxo sanguíneo nos órgãos, desta forma é possível recriar a distribuição dinâmica de nutrientes, além de sinais mecânicos, nos tecidos artificiais. Sun *et cols.* (2019) sugerem que os sistemas microfluídicos têm o potencial de simular a complexidade do metabolismo multiorgânico e da farmacocinética devido a ligação de diferentes órgãos em um *chip* e a possibilidade de cultivar as células tumorais, o que imita o desenvolvimento do tecido tumoral de forma mais próxima da realidade. Além disso, Tian *et cols.* (2020) esclarecem que as plataformas de engenharia integradas podem recapitular características complexas do tumor *in vivo* em nível de microescala, como o microambiente tumoral, melhorando assim a correlação entre os resultados derivados de ensaios pré-clínicos e clínicos na avaliação de nanomedicamentos anticancerígenos.

O modelo de OoC pode ser utilizado para construção de variados tipos de órgãos, assim como também de tumores sólidos. Sobre a utilização de ToC para estudo do GBM, Xie *et cols.* (2023) destacam que as plataformas *GBM-on-a-chip* podem integrar unidades funcionais biológicas ou químicas de um tumor em um *chip*, imitando funções *in vivo* das células de GBM, e que nos últimos anos, tem havido esforços para construir modelos baseados em microfluídica e bioimpressão. As unidades microfluídicas podem ser integradas aos modelos 3D (organóides) por exemplo, sendo usada para controlar seu ambiente local, simulação dinâmica de comportamentos celulares e leitura em tempo real de dados de testes de drogas (Sun *et al.*, 2019). Outro uso dos modelos de ToC é o estudo de metástase em câncer que emergem como poderosos preditores de progressão da doença. Esses estudos oferecem condições semelhantes às fisiológicas onde as determinantes mecanicistas da doença podem ser avaliados com facilidade, o autor afirma que o emprego da tecnologia OoC permitiria às empresas farmacêuticas e aos médicos testar novos compostos terapêuticos e terapias (Caballero *et al.*, 2017). Em um estudo realizado por Mamani *et al.* (2020), utilizou-se o modelo ToC para tratamento do GBM, através de hipertermia magnética, nesse modelo nanopartículas magnéticas dispersas em meio aquoso foram injetadas na cavidade central do chip, entrando em contato com cultura celular 3D de células tumorais submetidas a campo magnético alternado gerando calor,



transformando energia magnética em energia térmica, nesse estudo a terapia mostrou eficiência no tratamento do tumor com lise de todas as células tumorais após 30 minutos de hipertermia. Os pesquisadores sugerem que o modelo de mimetização de tumores visa futuramente substituir o uso de modelos murinos. Sobre uma desvantagem dos modelos OoC, Danku *et cols.* (2022) discutem que as dimensões do fluido utilizadas nesse modelo são muito pequenas, sendo assim os efeitos de superfície dominam o efeito de volume, parte do produto de interesse ser adsorvido e isto pode refletir na má qualidade da análise, ele enfatiza também que como o fluxo laminar está presente na interseção de vários fluidos, os fluidos de interesse podem não se misturar.

## ESTRATÉGIAS EXPERIMENTAIS *IN VIVO*

Experimentos *in vivo* funcionam como uma continuação das etapas *in vitro*, esse avanço permite que os resultados sejam validados, ou seja, as descobertas *in vitro* precisam sempre ser complementadas com modelos *in vivo* (Robertson *et al.*, 2019). A utilização de mamíferos nas etapas *in vivo* da fase pré-clínica da pesquisa é crucial, os ratos por exemplo podem ser usados para estudar tumores e são eficazes na recapitulação das características fisiológicas da patologia do glioma humano, várias características podem ser demonstradas, como infiltração e invasão cerebral, e podem ser usadas para questões de origem celular e genes envolvidos na iniciação tumoral versus progressão tumoral (Janbazian *et al.*, 2014). O GBM pode ser inserido em camundongos em modelo ortotópico ou heterotópico (em local diferente da origem), também pode ser transplantado em embriões dentro do útero de fêmeas grávidas. Através de um estudo realizado por Hoffmann *et cols.* (2020), as células integradas no cérebro do camundongo espelham as principais características patológicas associadas ao tumor, como infiltração, vascularização e microambiente tumoral complexo, incluindo astrócitos reativos e infiltração de células imunes do hospedeiro, o autor enfatiza que o modelo embrionário é uma forma rápida e eficiente de estudar a biologia de tumores específicos em camundongos imunocompetentes.

Atualmente vários modelos tumorais não mamíferos têm sido utilizados para estudo do cancer como *drosophila* (Munnik *et al.*, 2022) e vertebrados como o peixe zebra (*Danio rerio*), Hason *et cols.* (2019), os autores discutem que a conservação evolutiva dos programas relacionados com o câncer entre humanos e peixes-zebra é impressionante e permite a extrapolação dos resultados da investigação obtidos em peixes para os humanos. A implantação de células tumorais em peixe-zebra pode ser usada para estudar a progressão do tumor, eficácia de medicamentos, bem como estudar migração e metástase. Os embriões transparentes permitem estudos de imagem que visualizam o comportamento das células tumorais e as interações do tecido hospedeiro, por ex: interações microglia-células tumorais (Hamilton *et al.*, 2016). Dessa forma o peixe zebra tem se mostrado um modelo promissor de xenoinxerto para estudos de invasão tumoral. Mazzolini *et cols.*

(2020) enfatizam que a transparência aliada à facilidade de manipulação genética o torna um ótimo modelo para estudos de imagens vivas e Fazio *et cols.* (2020) demonstram que o peixe-zebra do tipo selvagem antes de desenvolver pigmentação permite imagens de fácil resolução tanto de células individuais quanto de análise e quantificação de células transplantadas, o autor também afirma que esta é uma característica superior a outro modelo de transplante utilizando outro organismo.

Outra característica que favorece a utilização deste modelo em pesquisas está ligada à imunidade desses indivíduos, período em que o desenvolvimento da imunidade inata se inicia no primeiro dia após a fecundação, enquanto a imunidade adaptativa tem um período maior para iniciar, apenas cerca de 2- 3 semanas após a fertilização, esta pequena janela de incompetência imunológica durante o desenvolvimento larval inicial permite o transplante e a sobrevivência a curto prazo destes indivíduos transplantados com células humanas ou de rato (Fazio *et al.*, 2020). Em algumas abordagens as células cancerígenas transplantadas em cepas de peixe-zebra transparentes podem ser marcadas com fluorescência, e monitoradas através da vasculatura que pode ser marcada com uma proteína fluorescente contrastante, havendo extravasamento essas células podem ser identificadas e contadas através de microscopia de fluorescência (Roth *et al.*, 2022). A utilização do peixe-zebra em alguns estudos permite a observação automática do crescimento tumoral e da sobrevivência de peixes enxertados com tumores de pacientes (PDX) no qual é possível observar heterogeneidade de crescimento, invasão e sobrevivência, assim como a avaliação *in vivo* de medicamentos, como marizomibe, atualmente utilizado em ensaios clínicos para GBM (Almstedt *et al.*, 2022).

Os estudos também variam em relação à idade do peixe-zebra, alguns transplantes podem ser realizados em embriões 24 ou 48 horas ou 3 dias após a fecundação, também têm sido realizados em juvenis com 30 ou 90 dias de vida, neste caso é geralmente realizada a supressão do sistema imunológico de peixes adultos. Uma questão importante em relação ao xenoenxerto de células de glioma em peixe-zebra é a diferença de temperatura entre as células e o peixe, que deve ser ajustada para o sucesso do ensaio. Considerando que o peixe vive a uma temperatura em torno de 28° graus e as células em cultura em torno de 37° graus, Pliakopanou *et cols.*(2024) sugere que a aclimação gradual dos peixes e das células considerando um ajuste para 32-33°C pode resolver o diferencial de temperatura entre células de peixe-zebra e GBM.

Na tabela 1 apresenta-se as principais vantagens e desvantagens do uso dos modelos *in vitro* e *in vivo* utilizados nos testes pré-clínicos.

Modelos	Vantagens	Desvantagens
<b>Cultura 2D</b>	Baixo custo e fácil de manter. Permite modelos escalonáveis e homogêneos de cultura celular, abordagens de imagem, triagem e quantificação. Fornecem informações sobre adesão e migração.	Podem divergir morfológicamente, genética ou epigeneticamente. Ausência do microambiente tumoral e simplificação das interações célula a célula. Pode modificar a biodisponibilidade do medicamento.
<b>Cultura 3D</b> <b>Esferóides</b>	Morfologia fisiológica. Arquitetura, manutenção da expressão genética e padrão genômico quase idênticos ao tumor original. Interação célula a célula.	Ausência de vascularização.
<b>Organóides</b>	Características necróticas e hipóxicas, estados celulares quiescentes, proliferativos e de diferenciação, características histológicas, e perfis mutacionais. Alta heterogeneidade. Pode-se usar células específicas do paciente. Dinâmica da fisiologia do tumor, mimetismo fisiológico, microambiente tumoral.	Alto custo, difícil de cultivar. Ausência de vascularização e de funções inerentes aos órgãos <i>in situ</i> .
<b>Organ-on-chip</b>	Pode simular o fluxo sanguíneo nos órgãos e recriar a distribuição dinâmica de nutrientes, além de sinais mecânicos, nos tecidos artificiais Baixo custo, vários sistemas microfluídicos podem ser integrados em um chip, economizando espaço e dinheiro.	Efeitos de superfície.
<b>Modelos in vivo</b> <b>Ratos e camundongos</b>	Recapitulação das características fisiológicas da patologia do glioma humano, como infiltração, invasão cerebral, vascularização e microambiente tumoral complexo.	Alto custo e manutenção Difíceis de manter Poucas réplicas por estudo
<b>Peixe zebra</b>	Permitem estudos de imagem que visualizam o comportamento das células tumorais e as interações do tecido hospedeiro Baixo custo Amplas réplicas por estudo	Não substitui a necessidade da execução da etapa dos testes pré-clínicos em mamíferos
<b>Drosófila</b>	A vida útil é curta, grande número de descendentes, anatomia bem descrita, facilidade de dissecação e visualização de tecidos complexos. Variadas ferramentas genéticas de drosófilas que permitem identificar novas funções genéticas.	Diferenças anatômicas entre drosófilas e humanos oferecendo limitações.

Tabela 1. Vantagens e desvantagens do uso de modelos *in vitro* e *in vivo*

## CONCLUSÃO

Sabe-se que o desenvolvimento de tratamentos para GBM necessita de estudos detalhados em modelos experimentais reprodutíveis que ofereçam resultados claros e honestos. Considerando a complexidade do GBM e todas as dificuldades envolvidas no desenvolvimento de terapias eficazes que dependem diretamente de estudos que reproduzam: características como o microambiente e a histologia tumoral, entende-se que todas as abordagens existentes são importantes e permitem a coleta de informações críticas na fase pré-clínica dos estudos. Estudos *in vitro*, partindo do modelo menos complexo (2D) até modelos mais complexos como o (3D) podem fornecer informações muito relevantes, incluindo o nível de eficácia do medicamento, como continuidade nas etapas mais elaboradas das fases pré-clínicas e obtendo estudos em modelos *in vivo*, é possível realizar enxertia tumoral em animais como mamíferos ou peixes no mesmo local de origem (ortotópico). No entanto, ainda estão a ser feitas novas abordagens que estimulam descobertas ao nível de: mecanismos intrínsecos às células (transcricionais/epigenéticos e metabólicos), sinalização célula-célula, nicho e microambiente, sinais sistêmicos, regulação imunológica e forças físicas ao nível dos tecidos.

## CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que a pesquisa foi realizada na ausência de qualquer relação comercial ou financeira que pudesse ser interpretada como um possível conflito de interesses.

## FINANCIAMENTO

Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da bolsa de Danielle da Silva Fraga Gomes, doutoranda do Programa Associado de Pós-graduação em Biotecnologia Marinha do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM) e da Universidade Federal Fluminense (UFF).

## REFERÊNCIAS

Abu-Dawas S, Alawami H, Zourob M, Ramadan Q. Design and Fabrication of Low-Cost Microfluidic Chips and Microfluidic Routing System for Reconfigurable Multi-(Organ-on-a-Chip) Assembly. *Micromachines* (Basel). 2021 Dec 11;12(12):1542

Akay, M., Hite, J., Avci, N. G., Fan, Y., Akay, Y., & Lu, G. (2018). Drug Screening of Human GBM Spheroids in Brain Cancer Chip. *Scientific Reports*, October 2017, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33641-2>

Almstedt E, Rosén E, Gloger M, Stockgard R, Hekmati N, Koltowska K, Krona C, Nelander S. Real-time evaluation of glioblastoma growth in patient-specific zebrafish xenografts. *Neuro Oncol*. 2022 May 4;24(5):726-738. doi: 10.1093/neuonc/noab264.

- Boccellato, C., & Rehm, M. (2022). Glioblastoma, from disease understanding towards optimal cell-based in vitro models. *Cellular Oncology*, 45(4), 527–541. <https://doi.org/10.1007/s13402-022-00684-7>
- Caballero, D., Kaushik, S., Correló, V. M., Oliveira, J. M., Reis, R. L., & Kundu, S. C. (2017). Organ-on-chip models of cancer metastasis for future personalized medicine: from chip to the patient. *Biomaterials*. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.10.005>
- Carla, C., Schweiger, M. W., Wurdinger, T., & Tannous, B. A. (2019). Patient-Derived Glioma Models : From Patients to Dish to Animals. *Cells*. 2019 Sep 30;8(10):1177. doi: 10.3390/cells8101177
- Chen, J., Li, Y., Yu, T. S., McKay, R. M., Burns, D. K., Kernie, S. G., & Parada, L. F. (2012). A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature*, 488(7412), 522–526. <https://doi.org/10.1038/nature11287>
- Calabrese, C., Poppleton, H., Kocak, M., Hogg, T. L., Fuller, C., Hamner, B., Oh, E. Y., Gaber, M. W., Finklestein, D., Allen, M., Frank, A., Bayazitov, I. T., Zakharenko, S. S., Gajjar, A., Davidoff, A., & Gilbertson, R. J. (2007). A Perivascular Niche for Brain Tumor Stem Cells. *Cancer Cell*, 11(1), 69–82. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.11.020>
- Cuddapah, V. A., Robel, S., Watkins, S., & Sontheimer, H. (2014). A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(7), 455–465. <https://doi.org/10.1038/nrn3765>
- Danku AE, Dulf EH, Braicu C, Jurj A, Berindan-Neagoe I. Organ-On-A-Chip: A Survey of Technical Results and Problems. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022 Feb 10;10:840674. doi: 10.3389/fbioe.2022.840674.
- Diao, W., Tong, X., Yang, C., Zhang, F., Bao, C., Chen, H., Liu, L., Li, M., Ye, F., Fan, Q., Wang, J., & Ouyang, Z. C. (2019). Behaviors of Glioblastoma Cells in in Vitro Microenvironments. *Scientific Reports*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36347-7>
- Evans, S. M., Judy, K. D., Dunphy, I., Timothy Jenkins, W., Hwang, W. T., Nelson, P. T., Lustig, R. A., Jenkins, K., Magarelli, D. P., Hahn, S. M., Collins, R. A., Grady, S., & Koch, C. J. (2004). Hypoxia is important in the biology and aggression of human glial brain tumors. *Clinical Cancer Research*, 10(24), 8177–8184. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1081>
- Fazio M, Ablain J, Chuan Y, Langenau DM, Zon LI. Zebrafish patient avatars in cancer biology and precision cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2020 May;20(5):263-273. doi: 10.1038/s41568-020-0252-3. Epub 2020 Apr 6
- Guyon, J., Andrique, L., Pujol, N., Røslund, G. V., Recher, G., Bikfalvi, A., & Daubon, T. (2020). A 3D spheroid model for glioblastoma. *Journal of Visualized Experiments*, 2020(158), 1–8. <https://doi.org/10.3791/60998>
- Hason M, Bartůňek P. Zebrafish Models of Cancer-New Insights on Modeling Human Cancer in a Non-Mammalian Vertebrate. *Genes (Basel)*. 2019 Nov 15;10(11):935. doi: 10.3390/genes10110935
- Heinrich, M. A., Bansal, R., Lammers, T., Zhang, Y. S., Michel Schiffelers, R., & Prakash, J. (2019). 3D-Bioprinted Mini-Brain: A Glioblastoma Model to Study Cellular Interactions and Therapeutics. *Advanced Materials*, 31(14), 1–9. <https://doi.org/10.1002/adma.201806590>

Hoffmann, N., Pereira, C., Hoffmann, N., & Ferna, V. (2020). *Article A Xenotransplant Model of Human Brain Tumors in Wild-Type Mice A Xenotransplant Model of Human Brain Tumors in Wild-Type Mice*. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.100813>

Hubert, C. G., Rivera, M., Spangler, L. C., Wu, Q., Stephen, C., Prager, B. C., Couce, M., Mclendon, R. E., Sloan, A. E., & Rich, J. N. (2017). *HHS Public Access*. 76(8), 2465–2477. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2402.A>

Jacob F, Salinas RD, Zhang DY, Nguyen PTT, Schnoll JG, Wong SZH, Thokala R, Sheikh S, Saxena D, Prokop S, Liu DA, Qian X, Petrov D, Lucas T, Chen HI, Dorsey JF, Christian KM, Binder ZA, Nasrallah M, Brem S, O'Rourke DM, Ming GL, Song H. A Patient-Derived Glioblastoma Organoid Model and Biobank Recapitulates Inter- and Intra-tumoral Heterogeneity. *Cell*. 2020 Jan 9;180(1):188-204.e22. doi: 10.1016/j.cell.2019.11.036

Janbazian, L., Karamchandani, J., & Das, S. (2014). Mouse models of glioblastoma: Lessons learned and questions to be answered. *Journal of Neuro-Oncology*, 118(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11060-014-1401-x>

Jeibmann, A., Paulus, W., &Kla, C. (2010). *Glioblastoma Models in Drosophila Melanogaster*. 1–5. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0022540>

Krieger, T. G., Tirier, S. M., Park, J., Jechow, K., Eisemann, T., Peterziel, H., Angel, P., Eils, R., & Conrad, C. (2020). Modeling glioblastoma invasion using human brain organoids and single-cell transcriptomics. *Neuro-Oncology*, 22(8), 1138–1149. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa091>

Lakkadwala S, Singh J. Co-delivery of doxorubicin and erlotinib through liposomal nanoparticles for glioblastoma tumor regression using an in vitro brain tumor model. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019 Jan 1;173:27-35. doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.09.047. Epub 2018 Sep 21

Luo, X., & Weiss, W. A. (2020). Utility of human-derived models for glioblastoma. *Cancer Discovery*, 10(7), 907–909. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0493>

Mamani, J. B., Marinho, B. S., Rego, G. N. de A., Nucci, M. P., Alvieri, F., Santos, R. S. Dos, Ferreira, J. V. M., Oliveira, F. A. de, & Gamarra, L. F. (2020). Magnetic hyperthermia therapy in glioblastoma tumor on-a-Chip model. *Einstein (Sao Paulo, Brazil)*, 18, eAO4954. [https://doi.org/10.31744/einstein\\_journal/2020AO4954](https://doi.org/10.31744/einstein_journal/2020AO4954)

Mazzolini J, Le Clerc S, Morisse G, Coulonges C, Kuil LE, van Ham TJ, Zagury JF, Sieger D. Gene expression profiling reveals a conserved microglia signature in larval zebrafish. *Glia*. 2020 Feb;68(2):298-315. doi: 10.1002/glia.23717

Mega, A., Hartmark Nilsen, M., Leiss, L. W., Tobin, N. P., Miletic, H., Sleire, L., Strell, C., Nelander, S., Krona, C., Hägerstrand, D., Enger, P., Nistér, M., & Östman, A. (2020). Astrocytes enhance glioblastoma growth. *Glia*, 68(2), 316–327. <https://doi.org/10.1002/glia.23718>

Mirzoyan Z, Sollazzo M, Allocca M, Valenza AM, Grifoni D, Bellosta P. *Drosophila melanogaster*: A Model Organism to Study Cancer. *Front Genet*. 2019 Mar 1;10:51. doi: 10.3389/fgene.2019.00051

Mpekris, F., Voutouri, C., Baish, J. W., Duda, D. G., Munn, L. L., Stylianopoulos, T., & Jain, R. K. (2020). Combining microenvironment normalization strategies to improve cancer immunotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(7), 3728–3737. <https://doi.org/10.1073/pnas.1919764117>

- Musah-Eroje, A., & Watson, S. (2019). A novel 3D in vitro model of glioblastoma reveals resistance to temozolomide which was potentiated by hypoxia. *Journal of Neuro-Oncology*, 142(2), 231–240. <https://doi.org/10.1007/s11060-019-03107-0>
- Munnik, C., Xaba, M. P., & Malindisa, S. T. (2022). *Drosophila melanogaster* : A platform for anticancer drug discovery and personalized therapies. *August*, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.949241>
- Nakada, M., Kita, D., Watanabe, T., Hayashi, Y., Teng, L., Pyko, I. V., & Hamada, J. (2011). Aberrant Signaling Pathways in Glioma. 3242–3278. <https://doi.org/10.3390/cancers3033242>
- Maher, E. A., & Bachoo, R. M. (2014). Glioblastoma. In *Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease: Fifth Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410529-4.00078-4>
- Pliakopanou A, Antonopoulos I, Darzenta N, Serifi I, Simos YV, Katsenos AP, Bellos S, Alexiou GA, Kyritsis AP, Leonardos I, Vezyraki P, Peschos D, Tsamis KI. Glioblastoma research on zebrafish xenograft models: a systematic review. *Clin Transl Oncol*. 2024 Feb;26(2):311-325. doi: 10.1007/s12094-023-03258-7. Epub 2023 Jul 3.
- Osswald, M., Jung, E., Sahm, F., Solecki, G., Venkataramani, V., Blaes, J., Weil, S., Horstmann, H., Wiestler, B., Syed, M., Huang, L., Ratliff, M., KarimianJazi, K., Kurz, F. T., Schmenger, T., Lemke, D., Gömmel, M., Pauli, M., Liao, Y., ... Winkler, F. (2015). Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. *Nature*, 528(7580), 93–98. <https://doi.org/10.1038/nature16071>
- Poon, C. C., Sarkar, S., Yong, V. W., & Kelly, J. J. P. (2017). Glioblastoma-associated microglia and macrophages: Targets for therapies to improve prognosis. *Brain*, 140(6), 1548–1560. <https://doi.org/10.1093/brain/aww355>
- Quail, D. F., & Joyce, J. A. (2017). The Microenvironmental Landscape of Brain Tumors. *Cancer Cell*, 31(3), 326–341. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.02.009>
- Read RD. *Drosophila melanogaster* as a model system for human brain cancers. *Glia*. 2011 Sep;59(9):1364-76. doi: 10.1002/glia.21148. Epub 2011 May 2 Review, I. (2011). *Brain Tumor Rehabilitation*. 90(5), 50–62. <https://doi.org/10.1097/PHM.0b013e31820be31f>
- Roth, S. M., Berens, E. B., Sharif, G. M., Glasgow, E., & Wellstein, A. (2022). *Cancer cell invasion and metastasis in zebrafish models (Danio rerio)*. 3–16. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1350-4>
- Sun, W., Luo, Z., Lee, J., Kim, H., Lee, K., Tebon, P., Feng, Y., Dokmeci, M. R., Sengupta, S., & Khademhosseini, A. (2019). *Organ-on-a-Chip for Cancer and Immune Organs Modeling*. 1801363, 1–12. <https://doi.org/10.1002/adhm.201801363>
- Robertson, F. L., Marqués-Torrejón, M. A., Morrison, G. M., & Pollard, S. M. (2019). Experimental models and tools to tackle glioblastoma. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 12(9). <https://doi.org/10.1242/dmm.040386>
- Schaff LR, Mellinshoff IK. Glioblastoma and Other Primary Brain Malignancies in Adults: A Review. *JAMA*. 2023 Feb 21;329(7):574-587. doi: 10.1001/jama.2023.0023.
- Salcman, M. (n.d.). Specialty Rounds Glioblastoma multiforme. *The American Journal of Medical Science*, 279(2), 84–94. <https://doi.org/10.1097/00000441-198003000-00001>

Stanke, K. M., & Kidambi, S. (2023). *Direct-Contact Co-culture of Astrocytes and Glioblastoma Cells Patterned Using Polyelectrolyte Multilayer Templates*.

Stroka, K. M., Jiang, H., Chen, S. H., Tong, Z., Wirtz, D., Sun, S. X., & Konstantopoulos, K. (2014). Water permeation drives tumor cell migration in confined microenvironments. *Cell*, *157*(3), 611–623. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.052>

Stupp, R., Taillibert, S., Kanner, A., Read, W., Steinberg, D. M., Lhermitte, B., Toms, S., Idhahbi, A., Ahluwalia, M. S., Fink, K., Di Meo, F., Lieberman, F., Zhu, J. J., Stragliotto, G., Tran, D. D., Brem, S., Hottinger, A. F., Kirson, E. D., Lavy-Shahaf, G., ... Ram, Z. (2017). Effect of tumor-treating fields plus maintenance temozolomide vs maintenance temozolomide alone on survival in patients with glioblastoma a randomized clinical trial. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, *318*(23), 2306–2316. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.18718>

Tian C, Zheng S, Liu X, Kamei KI. Tumor-on-a-chip model for advancement of anti-cancer nano drug delivery system. *J Nanobiotechnology*. 2022 Jul 20;*20*(1):338. doi: 10.1186/s12951-022-01552-0.

Suvà ML, Tirosh I. The Glioma Stem Cell Model in the Era of Single-Cell Genomics. *Cancer Cell*. 2020 May 11;*37*(5):630-636. doi: 10.1016/j.ccell.2020.04.001

Touat M, Idhahbi A, Sanson M, Ligon KL. Glioblastoma targeted therapy: updated approaches from recent biological insights. *Ann Oncol*. 2017 Jul 1;*28*(7):1457-1472. doi: 10.1093/annonc/mdx106

Trujillo-de Santiago, G., Flores-Garza, B. G., Tavares-Negrete, J. A., Lara-Mayorga, I. M., González-Gamboa, I., Zhang, Y. S., Rojas-Martínez, A., Ortiz-López, R., & Álvarez, M. M. (2019). The tumor-on-chip: Recent advances in the development of microfluidic systems to recapitulate the physiology of solid tumors. *Materials*, *12*(18). <https://doi.org/10.3390/ma12182945>

Xie, Z., Chen, M., Lian, J., Wang, H., & Ma, J. (2023). *Glioblastoma-on-a-chip construction and therapeutic applications*. July, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1183059>

Weil, S., Osswald, M., Solecki, G., Grosch, J., Jung, E., Lemke, D., Ratliff, M., Hänggi, D., Wick, W., & Winkler, F. (2017). Tumor microtubes convey resistance to surgical lesions and chemotherapy in gliomas. *Neuro-Oncology*, *19*(10), 1316–1326. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox070>

Wirtz, D., Konstantopoulos, K., & Searson, P. C. (2011). The physics of cancer: The role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nature Reviews Cancer*, *11*(7), 512–522. <https://doi.org/10.1038/nrc3080>

Xu, H., Li, Z., Yu, Y., Sizdahkhani, S., Ho, W. S., Yin, F., Wang, L., Zhu, G., Zhang, M., Jiang, L., Zhuang, Z., & Qin, J. (2016). A dynamic in vivo-like organotypic blood-brain barrier model to probe metastatic brain tumors. *Scientific Reports*, *6*(November), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep36670>

Yang, X., Cui, W., Gu, A., Xu, C., Yu, S., Li, T., & Cui, Y. (2013). *A Novel Zebrafish Xenotransplantation Model for Study of Glioma Stem Cell Invasion*. *8*(4), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061801>

Yao, M., Li, S., Wu, X., Diao, S., Zhang, G., He, H., Bian, L., & Lu, Y. (2018). Cellular origin of glioblastoma and its implication in precision therapy. *Cellular and Molecular Immunology*, *15*(8), 737–739. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.159>

Zamecnik, J. (2005). The extracellular space and matrix of gliomas. *Acta Neuropathologica*, *110*(5), 435–442. <https://doi.org/10.1007/s00401-005-1078-5>



Zhang, C., Jin, M., Zhao, J., Chen, J., & Jin, W. (2020). Organoid models of glioblastoma: advances, applications and challenges. *American Journal of Cancer Research*, 10(8), 2242–2257. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32905502><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC7471358>

Zhu, P., Du, X. L., Lu, G., & Zhu, J. J. (2017). Survival benefit of glioblastoma patients after FDA approval of temozolomide concomitant with radiation and bevacizumab: A population-based study. *Oncotarget*, 8(27), 44015–44031. <https://doi.org/10.18632/oncotarg>